

Aus der Klinik für Onkologie, Hämatologie, Klinische Immunologie und
Rheumatologie
der medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. Michael Pfreundschuh/ Prof. Dr. Stephan Stilgenbauer

**Einfluss von Vitamin-D auf Cathelicidin, einen Marker für die
Aktivierung der ADCC durch Rituximab bei Patienten mit
hochmalignen B-Zell Lymphomen**

Dissertation zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

2018

vorgelegt von

Viviane Doris Vosgerau

geboren am 16.09.1988 in Kiel, Schleswig-Holstein

München, 2018

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes am:

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der der Universität des Saarlandes:

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:
Erster Berichterstatter/Doktorvater:
Prof. Dr. med. Michael Pfreundschuh/ Prof. Dr. med. Gunter Aßmann
Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:

Dekan der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes:
Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Zusammenfassung	1
Summary	2
Einleitung.....	3
1.1 Vitamin-D.....	3
1.1.1 Die Doppelrolle des Vitamin-D.....	3
1.1.2 Die körpereigene Synthese von Vitamin-D	3
1.1.3 Vitamin-D-Insuffizienz.....	7
1.2 Non-Hodgkin-Lymphom.....	9
1.3 Die Immuntherapie.....	11
1.3.1 Immuntherapie mit dem monoklonalen Antikörper Rituximab.....	11
1.3.2 Wirkmechanismus von Rituximab	14
1.3.3 Die antikörperabhängige Zytotoxizität	14
1.3.4 Die komplementabhängige Zytotoxizität (CDC)	16
1.3.5 CD 20 als direktes intrazelluläres Signal.....	18
1.4 Cathelicidin	19
1.4.1 Das antimikrobielle Peptid Cathelicidin	19
1.4.2 Cathelicidin-Expression	20
2 Hypothese und Fragestellung	21
3 Material und Methodik.....	23
3.1 Verzeichnis verwendeter Materialien.....	23
3.1.1 Geräte	23
3.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	23
3.1.3 Chemikalien, Zusammensetzungen (Kits)	24
3.1.4 Hard- und Software	24
3.2 Studiengruppe DSHNHL	24
3.3 Serumproben	25
3.3.1 Serumproben aus der CHOP-R-esc/ Dense-R-Up-CHOP-14 Studie	26
3.3.2 Serumproben aus der RICOVER 60 Studie	27
3.3.3 Serumproben aus der UNFOLDER Studie.....	27
3.4 Kühlung und Transport	27
3.5 Labor-Methoden.....	27
3.5.1 Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA)	28
3.5.2 Vitamin-D-Bestimmung.....	30
3.6 Statistische Methoden.....	30
4 Ergebnisse.....	31
4.1 Patientencharakteristika.....	32
4.2 Vergleich der Cathelicidinkonzentrationen in der Dense-R-CHOP und in der Standard-R-CHOP Population an Tag 1 der Therapie	35
4.3 Vergleich der Cathelicidinkonzentrationen in der Dense-R-CHOP und in der Standard-R-CHOP Population an Tag 15 der Therapie	36

4.4 Vergleich der Cathelicidinkonzentrationen in der Dense-R-CHOP und in der Standard-R-CHOP Population an Tag 29 der Therapie	37
4.5 Vergleich der Cathelicidinkonzentrationen in der Dense-R-CHOP und in der Standard-R-CHOP Population an Tag 43 der Therapie	39
4.6 Graphische Darstellung der Cathelicidinkonzentrationen der Dense-R-CHOP Therapiegruppe im Therapieverlauf	41
4.7 Graphische Darstellung der Cathelicidinkonzentrationen der Standard-R-CHOP Therapiegruppe im Therapieverlauf	42
4.8 Cathelicidinkonzentrationen im Therapieverlauf.....	43
4.9 Vitamin-D-Konzentrationen an Tag 1 der Therapie.....	44
4.10 Zusammenhang der Cathelicidinkonzentrationen im Therapieverlauf, der Cathelicidinkonzentration an Tag 1 und der Vitamin-D-Konzentration	45
5 Diskussion.....	47
5.1 Cathelicidinkonzentrationen im Therapieverlauf.....	47
5.2 Cathelicidinmessungen und Patientencharakteristika	52
5.3 Cathelicidinkonzentrationen im Zusammenhang der gemessenen Vitamin-D-Konzentrationen	53
Literaturverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	XIII
Tabellenverzeichnis	XIII
Danksagung	XIV
Eidesstattliche Erklärung	XV

Abkürzungsverzeichnis

1 α -OHase	25-Hydroxyvitamin-D-1- α -Hydroxylase
24-Hydroxylase	CYP24, 24OHase
ADCC	engl.: antibody dependent cellular cytotoxicity, dt.: ,antikörperabhängige zellvermittelte Toxizität
CLL	chronisch lymphatischer Leukämie
CalcioI	Vitamin-D3 (Cholecalciferol)
Calcidiol	25-Hydroxyvitamin-D3, 25(OH) D3, 15-Hydroxycholecalcoferol, Calcifediol
Calcitriol	1,25 Hydroxyvitamin-D3, (1,25(OH)2D3, 1,25 Dihydroxycholecalciferol
CD	engl.: Cluster of Differentiation, dt.: Unterscheidungsgruppe
CDC	engl.: complement-dependent cytotoxicity, dt.: Komplement-abhängige Zytotoxizität
CHOP	Zytostatikakombination: Cyclophosphamid (C), Doxorubicin (H), Vincristin (O) und Prednisolon (P)
CR	engl. complete remission, dt.: komplette Remission
CRP	komplementregulierende Proteine
DBP	Vitamin-D-bindende Proteine
DLBCL	diffus großzelliges B-Zell Lymphom
DSHNHL	Deutsche Studiengruppe Hochmaligner Non-Hodgkin Lymphome
EFS	engl.: event-free survival, dt.: ereignisfreie Überleben
ELISA	engl.: Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay, dt.: enzymatisches Immunabsorptionsverfahren
Fab	engl. fragment antigen binding, dt.: Antikörperfragment zur Antigen- / Haptenbindung
Fc	engl. fragment cristallizable, dt.: kristallisiertes Antikörperfragment
FGF23	engl.: fibroblast growth factor 23, dt.: Fibroblasten Wachstumsfaktor23
ELISA	Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay
EFS	engl.: Event-free survival rate, dt.: ereignisfreies Überleben
IE	Internationale Einheit
Ig	Immunglobulin
IPI	Internationale Prognostische Index
LDH	Lactatdehydrogenase
LL-37	Cathelicidin

MAC	Membranangriffskomplex
MED	minimale Erythem Dosis
MInT-Studie	MabThera International Trial Gruppe
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
ORR	engl. objective response rate, dt.: objektive Ansprechrare
OS	engl.: 3-year overall survival, dt.: 3-Jahres Überleben
OVR	engl.: overall survival rate, dt.: Gesamtüberleben
PR	engl. partial remission, dt.: partielle Remission
Precursor-Zellen	dt.: Vorläufer-Zellen
PTLD	Posttransplantations-Lymphoproliferative Erkrankungen
R-CHOP	Rituximab (R), Cyclophosphamid (C), Doxorubicin (H), Vincristin (O) und Prednisolon (P)
SOC	engl.: store-operated channel, dt.: regulierender Kalziumkanal
TMB	Tetramethylbenzidin
VDRE	Vitamin-D-responsive Elemente

Zusammenfassung

Einfluss von Vitamin-D auf Cathelicidin, einen Marker für die Aktivierung der ADCC durch Rituximab bei Patienten mit hochmalignen B-Zell Lymphomen

Vitamin-D hat eine große Bedeutung für das angeborene als auch für das erworbene Immunsystem. Aktuelle Studien zeigen, dass eine ausreichende Vitamin-D Versorgung einen positiven Einfluss auf verschiedene Erkrankungen, wie zum Beispiel dem diffus großzelligen B-Zell-Lymphom, haben kann. Das diffus-großzellige B-Zell-Lymphom ist mit knapp 80% der aggressiven Non-Hodgkin-Lymphome die häufigste Neoplasie des lymphatischen Systems. Die aktuelle Therapie besteht aus einer Chemotherapie (CHOP-Schema) und dem monoklonalen CD20 Antikörper Rituximab. Der chimäre Antikörper Rituximab bindet an CD20 positive B-Zellen. Effektorzellen werden durch den Antikörper aktiviert und leiten über verschiedene Wege, wie zum Beispiel über die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität, eine Elimination der CD20 positiven Zielzellen ein. Vor allem natürliche Killerzellen zählen zu den Haupteffektorzellen. Nach Aktivierung der natürlichen Killerzelle wird das neben Granzymen und Perforinen gespeicherte zytotoxisch wirkende Propeptid Cathelicidin ausgeschüttet

Wir vermuteten, dass die freigesetzte Cathelicidinmenge mit der Rituximab-induzierten Zytotoxizität korrelieren müsste. Dazu wurde aus 60 seriellen Serumproben von Lymphompatienten, welche zu verschiedenen Zeitpunkten einer Immunochemotherapie nach R-CHOP Schema entnommen wurden, die Cathelicidinkonzentration gemessen. Zusätzlich wurde die Vitamin-D Konzentration bestimmt welches, wie Vorarbeiten zeigen konnten, ebenfalls einen Einfluss auf die Rituximab-induzierte Zytotoxizität hat.

Zunächst sollte gezeigt werden, (I) dass im Verlauf der Therapie Cathelicidin ansteigt, und (II) dies bei ausreichendem Vitamin D Spiegel in größerem Ausmaß geschieht und (III) ggf. mit einer besseren Prognose korreliert.

In dieser Arbeit zeigen sich jedoch weder einheitliche Verläufe der Cathelicidinkonzentration noch ein einheitlich positiver Verlauf der Cathelicidinkonzentration. In dieser Arbeit konnte nicht dargelegt werden, dass Cathelicidin während einer Immunochemotherapie bei Patienten mit diffus großzelligen B-Zell-Lymphom als Marker der Rituximab-induzierten Zytotoxizität dienen kann. Allerdings zeigten sich die Cathelicidinkonzentrationen in der Standard-Therapiegruppe signifikant höher als in der intensivierten Therapiegruppe. Dies korrelierte jedoch nicht mit der Prognose der Patienten.

Summary

The influence of Vitamin-D to Cathelicidin, a marker for the activation of ADCC by rituximab in patients with diffuse large-cell B-cell lymphoma

Vitamin-D is of utter importance to the innate as well as the acquired immune system. Recent studies show that an adequate vitamin-D supply may have a positive effect on various diseases, such as diffuse large B-cell lymphoma. Covering almost 80% of the aggressive Non-Hodgkin lymphomas the diffuse large-cell B-cell lymphoma is the most frequent neoplasia of the lymphatic system. Therapy includes an intensive chemotherapy (CHOP) with the monoclonal CD20 antibody Rituximab. The chimeric antibody rituximab binds to CD20 positive b-cells. Immune effector cells are activated and lead to an elimination of the CD20-positive target cell via various pathways, for example via the antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. Especially natural killer cells are the main effector cells. After the activation of the natural killer cell, the propeptide cathelicidin, which is stored next granzyme and perforins, is released and has cytotoxic activity.

We hypothesized that the amount of cathelicidin released is correlated to the amount rituximab mediated cytotoxicity. We measured cathelicidin in 60 serum samples collected serially during immunochemotherapy from lymphoma patients. Vitamin-D was measured as well, as it was shown to influence Rituximab induced cytotoxicity.

It had to be shown that (I) cathelicidin increases during therapy and (II) this increase may be higher in vitamin D replete patients and (III) this may lead to better prognosis.

However, neither a uniform cathelicidin concentration development nor a uniformly positive concentration development could be arrived in this study. In this analysis, we could not show that cathelicidin is a marker of rituximab induced cytotoxicity during immunochemotherapy for patients with diffuse large-cell B-cell lymphoma. However, the levels of cathelicidin in the standard therapy group were significantly higher than in the intensified therapy group. This did not lead to a better prognosis for these patients.

Einleitung

1.1 Vitamin-D

1.1.1 Die Doppelrolle des Vitamin-D

Vitamin-D gehört zusammen mit den Vitaminen A, E und K zur Gruppe der fettlöslichen Vitamine. Aufgrund seines Ursprungs aus Cholesterol, seiner Synthesemöglichkeit durch UV-Strahlung und seiner Funktion im menschlichen Körper nimmt das Vitamin-D eine Sonderstellung zwischen Vitaminen und Steroidhormonen ein.

Calcitriol (1,25-Dihydroxy-Vitamin-D₃, 1 α -25(OH)₂Vitamin-D₃) als physiologisch aktive Form des Vitamin-D₃ spielt eine bestimmende Rolle in der Regulierung des Kalzium- und Phosphatkonzentrationsspiegels und des Knochenstoffwechsels ¹.

Ein Zusammenhang zwischen Vitamin-D-Mangel und Rachitis bei Kindern sowie Osteomalazie bei Erwachsenen ist zweifelsfrei belegt ^{2,3}. Neben der Osteomalazie kommt es zusätzlich zu Muskelschwäche, welche zu Stürzen führen und Knochenbrüche begünstigen kann. In verschiedenen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen reduzierten Vitamin-D-Konzentrationen und einem erhöhten Risiko für osteoporotische Knochenbrüche (Oberschenkelhalsfrakturen) belegt werden ^{4,5}. Zusätzlich wird ein Zusammenhang zwischen Vitamin-D und der Entstehung von chronischen Erkrankungen, Krebserkrankungen, Autoimmunerkrankungen, Infektionserkrankungen, endokrinen oder kardiovaskulären Erkrankungen angenommen ⁵⁻⁷.

Dusoo et al. beschrieben, dass die Vitamin-D-Konzentration auch einen Einfluss auf Zellreifung, Zelldifferenzierung sowie auf Modulation des Immunsystems hat. Die aktive Form von Vitamin-D „Calcitriol“ kann intrazellulär an Vitamin-D-Rezeptoren binden, zum Zellkern gelangen und die Transkription von sogenannten Vitamin-D-responsiven Genen regulieren ¹.

Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) empfiehlt offiziell eine Vitamin-D-Serumkonzentration $\geq 30\text{ng/ml}$ für Erwachsene. Kann diese Konzentration nicht durch endogene Synthese mittels Sonnenlichtexposition oder über normale Ernährung zugeführt werden, wird zur Prävention zu geringer Vitamin-D-Konzentrationen im Körper eine tägliche Supplementation von 800 IE (IE: internationale Einheit; 1 IE = 0,025 μg) für Erwachsene empfohlen. Holick et al. empfehlen im Alter zwischen 19 und 50 Jahren eine Supplementation von mindestens 600 IE/Tag. Im Alter zwischen 50 und 70 Jahren wird sogar eine Zufuhr von mindestens 600 - 800 IE täglich für eine optimale Muskelfunktion und Knochengesundheit empfohlen ⁸.

1.1.2 Die körpereigene Synthese von Vitamin-D

Die Haut hat eine enorme Kapazität zur Produktion von Vitamin-D. Über 90% des Vitamin-D-Bedarfs wird über Sonnenlichtexposition durch ultraviolette Photosynthese bei Wellenlänge zwischen 290 und 315 nm über mehrere Zwischenschritte endogen im Körper aus Cholesterol produziert ³. Über die

Nahrung wie z.B. über fettreiche Fischarten wie Lachs, Makrelen oder Sardinen oder über Nahrungsergänzungsmittel wird nur ein geringer Anteil der Vitamin-D-Menge zu sich genommen ^{2,5}.

Die Ausgangssubstanz der endogenen Vitamin-D-Synthese ist das in der Leber synthetisierte Cholesterol. In der Leber wird Cholesterol zu 7-Dehydrocholesterol umgewandelt und mittels Vitamin-D-bindenden Proteinen (DBP) in die Haut transportiert. Durch Sonnenlichtexposition und Einfluss der UV-B Strahlung wird 7-Dehydrocholesterol fotochemisch in ein Prävitamin-D₃ umgewandelt. Aufgrund der thermodynamischen Instabilität des Prävitamins kommt es zu einer Isomerisierung und zur Entstehung des Vitamin-D₃, welches über DBP zurück zur Leber transportiert wird. In der Leber trifft das endogen synthetisierte Vitamin-D und das über die Nahrung aufgenommene Cholecalciferol (Vitamin-D₃ aus vor allem tierischen Produkten) und Ergocalciferol (Vitamin-D₂ vor allem aus pflanzlichen Produkten) zusammen. Durch die 25-Hydroxylase werden die in der Leber gesammelten Vitamin-D-Produkte zu 25-Hydroxycholecalciferol weiterverarbeitet ⁹. Da die Konzentration von 25-Hydroxycholecalciferol höher ist als das im nächsten Schritt produzierte 1,25 Dihydroxycholecalciferol, es eine Halbwertszeit von knapp drei Wochen hat und zusätzlich noch unabhängig der Nierenfunktion produziert wird, eignet sich 25-Hydroxycholecalciferol zur Bestimmung des Vitamin-D-Haushaltes im Körper ¹⁰.

Das in der Leber entstandene 25-Hydroxycholecalciferol wird über DBP weiter zur Niere transportiert und dort in den proximalen Tubuluszellen, aber auch in anderen Bereichen der Niere, wie in der Pars convoluta des distalen Tubulus, im Sammelrohr oder in der Henle-Schleife, durch die 25-Hydroxyvitamin-D-1- α -Hydroxylase (1 α OHase) in die biologisch aktive Form, 1,25 Dihydroxy-Vitamin-D₃ (1 α ,25(OH)₂Vitamin D₃, Calcitriol), katalysiert ^{1,2}.

Verschiedene Faktoren wie z.B. die Phosphat- oder die Kalziumkonzentration im Serum oder die Menge an Fibroblasten Wachstumsfaktor 23 (fibroblast growth factor 23, FGF23), haben einen Einfluss auf die renale Produktion von 1,25 Hydroxyvitamin-D₃. Hohe Konzentrationen von Kalzium oder Phosphat hemmen die Aktivität der 1 α OHase, niedrige Konzentrationen steigern die Aktivität der 1 α OHase. Hohe Konzentrationen des Parathormons stimulieren die Produktion der 1 α OHase und erhöhen die 1,25 Hydroxyvitamin-D₃ Konzentration. Kalzium übt weiterhin einen negativ-regulierenden Effekt auf das Parathormon aus.

Für den Abbau der aktiven Vitamin-D-Metaboliten in Calcitriolsäure ist die 24-Hydroxylase (CYP24, 24OHase) verantwortlich. Die Stimulation und die Aktivität der 24-Hydroxylase werden entsprechend der Faktoren der 1 α OHase reziprok reguliert und verhindern zu hohe Konzentrationen an Vitamin-D. Calcitriol selber hemmt die 1 α OHase und aktiviert die 24-Hydroxylase (negativer Feedback-Mechanismus) ⁵.

Im Dünndarm bindet Calcitriol an zelluläre Vitamin-D-Rezeptoren (VDR) und interagiert mit dem Retinsäure-X-Rezeptor (RXR). Der entstandene heterodimere VDR-RXR Komplex interagiert mit

Vitamin-D-responsiven Elementen (VDRE) an verschiedenen Genpromotoren. Induktion oder Hemmung von Zielgenen, den so genannten Vitamin-D-responsiven Genen, wird so induziert ¹¹. Im menschlichen Genom sind zwischen 200 ¹² und 900 ¹³ sogenannter Vitamin-D-responsiver Gene vorhanden. Über solche Gene hat die 1,25 Hydroxyvitamin-D₃-Konzentration Einfluss zum Beispiel auf den Einbau epithelialer Kalziumkanäle und kann darüber die intestinale Kalziumabsorption regulieren ⁹.

Zumeist indirekt über das Parathormon beeinflussen Östrogene, Glukokortikoide, Calcitonin, Somatotropin oder Prolaktin die 1,25 Hydroxyvitamin-D₃ Bildung. Glukokortikoide bewirken zum Beispiel eine verminderte Produktion von 1,25 Hydroxyvitamin-D₃. Eine verminderte Knochenmineralisation ist vor allem bei Patienten mit langandauernder Kortisontherapie, welche die 1 α OHase hemmt oder bei postmenopausalen Frauen mit einer verminderten Östrogenproduktion (Östrogene stimulieren die 1 α OHase) bekannt. Eine langfristige systemische Glukokortikoidtherapie sollte daher in Kombination mit einer Vitamin-D-Therapie – Vitamin-D in aktiver Form als Alfacalcidol - verabreicht werden ¹⁴.

Über 1,25(OH)-D₂-Rezeptoren an Osteoblasten hat Vitamin-D einen Einfluss auf die Knochenmineralisation. Bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen kann es zu einer Malabsorption von Vitamin-D-Produkten und dadurch zu einer verminderten Vitamin-D-Synthese kommen. Nieren- oder Lebererkrankungen oder ein primärer sowie sekundärer Hyperparathyroidismus können ebenfalls zu einer reduzierten Vitamin-D-Synthese führen ^{7,9,15}.

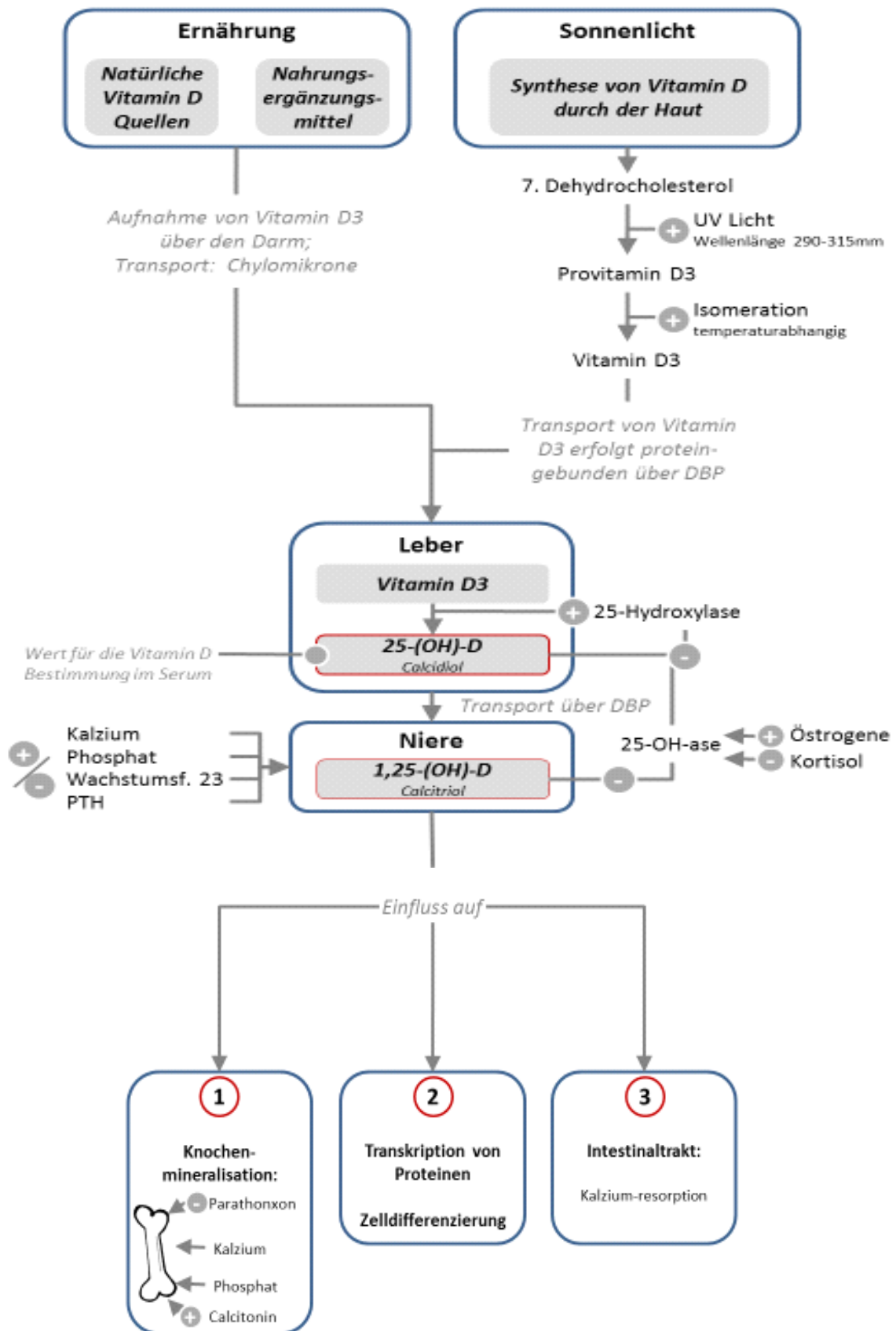


ABBILDUNG 1 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER VITAMIN-D-PRODUKTION UND SEINE VERSCHIEDENEN EINFLÜSSE, DBP: VITAMIN-D BINDENDE PROTEINE, WACHSTUMSFAKTOR23, ANGELEHNT AN HOLICK ET AL⁹.

1.1.3 Vitamin-D-Insuffizienz

Rosen und Holick et al. definieren für eine optimale Zellfunktion einen Vitamin-D-Spiegel ≥ 30 ng/ml. Eine Vitamin-D-Insuffizienz liegt bei Vitamin-D-Spiegeln zwischen 10 – 29 ng/ml, ein Mangel bei Werten unter 10 ng/ml vor^{9,15,16}. Diese Definition wird, wenn nicht anders benannt oder gekennzeichnet, in dieser Arbeit verwendet.

Weltweit wird derzeit eine unzureichende Vitamin-D-Konzentration, zusammengefasst aus Vitamin-D-Insuffizienz und Mangel, bei circa einer Milliarde Menschen geschätzt und gilt heute als pandemisches Problem^{5,9}.

Hauptursachen für eine reduzierte Vitamin-D-Konzentration im Serum sind eine verminderte Sonnenlichtexposition des Körpers, ein vermehrter Einsatz von Sonnenschutzcremes sowie eine gesteigerte Melaninpigmentation der Haut^{17,18}.

Auch Umwelteinflüsse, wie kurze Tage mit nur wenig Sonnenlicht oder das Vorhandensein von Smog, welcher eine Penetration der Sonnenstrahlung verhindert, sind nicht zu unterschätzende Faktoren, die eine verminderte Vitamin-D-Serumkonzentration bedingen können^{5,19}. Weitere Ursachen für einen verminderten Vitamin-D-Haushalt sind eine Reduktion der 7-Dehydrocholesterolmenge in den Hautschichten mit steigendem Alter, eine Hyperkeratose, eine verminderte Vitamin-D-Verfügbarkeit durch Malabsorption, verschiedene Nierenerkrankungen, welche die Umwandlung in 1,25 Hydroxyvitamin-D₃ reduzieren oder Medikamente, die einen vermehrten Katabolismus von Vitamin-D bedingen^{3,9,20,21}.

Auch die Jahreszeit und die geographische Breite haben einen Einfluss auf die Qualität und die Quantität der UV-Strahlung und dadurch einen Einfluss auf die Menge der Vitamin-D-Synthese. In einer Studie wurde gezeigt, dass aufgrund der starken Absorption der Sonnenstrahlen im Winter zwischen den Monaten Oktober bis März in Boston, USA (42°N), sowie in Edmonton, Kanada (52°N), fast keine Vitamin-D-Produktion in der Haut stattfand¹⁹.

Eine Studie des Robert Koch-Instituts ergab, dass bei knapp 60% der Bevölkerung in Deutschland im Alter zwischen 3 und 79 Jahren Vitamin-D-Konzentrationen unter 20 ng/ml nachzuweisen sind und ein Großteil der Bevölkerung damit unzureichend mit Vitamin-D versorgt ist (Robert-Koch-Institut)²². Vor allem ältere Menschen, in Versorgungseinrichtungen lebende Personen, länger hospitalisierte Patienten oder wenig Aktive weisen aufgrund einer geringeren Sonnenlichtexposition häufig einen reduzierten Vitamin-D-Haushalt auf. In einer Studie mit 1.578 Probanden (72% Frauen; Durchschnittsalter 82 Jahre), welche in einer Wohneinrichtung zur Betreuung und Pflege in Trier lebten, wurden bei 89% der Personen Vitamin-D-Werte unter 20 ng/ml und bei 67% sogar Werte im Bereich eines Vitamin-D-Mangels nachgewiesen. Nur 4% zeigten adäquate Vitamin-D-Konzentrationen von ≥ 30 ng/ml²³.

Um einen Mangel an Vitamin-D zu vermeiden, sollte täglich abhängig vom Pigmentierungsgrad der Haut die Körperoberfläche mit Sonnenlicht sensibel exponiert werden. In einer Studie zum Einfluss des Sonnenlichtes auf die Vitamin-D-Produktion wurden zwei Personengruppen untersucht. In der ersten

Gruppe wurde vor und nach einem Sonnenbankbesuch (1 MED UVB Strahlung; MED= minimale Erythem Dosis, definiert als die effektive UV-Dosis, die zu einer wahrnehmbaren Hautrötung von zuvor unbelichteter Haut führt ²⁴) die Vitamin-D-Konzentration im Blut gemessen. Eine zweite Personengruppe nahm eine tägliche Dosis Vitamin-D oral ein. Es konnte gezeigt werden, dass durch 1 MED UV-B Strahlung gleiche Konzentrationen von Vitamin-D wie nach oraler Einnahme von 250 – 500 µg (10.000 – 20.000 IE) Vitamin-D erreicht werden konnten. Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung legte als Richtlinie für Vitamin-D eine Supplementierung mit 800 IE pro Tag für Erwachsene fest. 1 MED ist somit äquivalent mit einer 10 bis 25-fachen Supplementationsempfehlung von Vitamin-D pro Tag ⁸. Langfristig reduzierte Vitamin-D-Konzentrationen könnten auch in Zusammenhang mit erhöhter Krebsinzidenz stehen ². Um den Einfluss von Vitamin-D bei älteren Patienten mit einem aggressiven diffus großzelliges B-Zell Lymphom (DLBCL) zu untersuchen, wurde in einer Studie aus 359 Patientenseren (RICOVER-60 Studie) die Vitamin-D-Konzentration gemessen. 54% der Patienten zeigten Vitamin-D-Konzentrationen von <10 ng/ml, 46% zeigten Vitamin-D-Konzentrationen von 10-30 ng/ml und nur eine Patientin zeigte ein Vitamin-D-Spiegel von >30 ng/ml. Eine retrospektive Auswertung zeigte, dass Patienten mit Vitamin-D-Konzentrationen ≥ 8 ng/ml eine bessere Prognose hatten. Das ereignisfreie Überleben lag bei 79% vs. 59% und die 3-Jahres-Überlebensrate betrug 82% vs. 70%.

Diese Studie weist darauf hin, dass die Vitamin-D-Konzentration einen Einfluss auf die Prognose älterer Patienten mit DLBCL hat. Dies könnte durch eine reduzierte Wirkung des Antikörpers Rituximab bedingt sein. Ob sich die Wirkung von Rituximab durch Vitamin-D steigern lässt, muss jedoch noch in prospektiven Studien untersucht werden ²⁵.

1.2 Non-Hodgkin-Lymphom

Lymphome entstehen durch maligne Transformation aus einer einzelnen klonal expandierenden Zelle des lymphatischen Systems. Aus historischen Gründen bezeichnet man alle Lymphome, die kein Hodgkin-Lymphom sind, als NHL., diese lassen sich in verschiedene Subtypen mit unterschiedlichen molekularbiologischen, pathohistologischen und klinischen Eigenschaften unterteilen^{26–30}.

NHL werden in die häufigeren B- und selteneren T-Zell Lymphome eingeteilt. Selten entstehen Lymphome aus natürlichen Killerzellen. Zusätzlich wird die Reife der Zelle unterschieden. Die Lymphomzelle kann aus unreifen Vorstufen oder aus reifen Lymphozyten oder NK entstammen ("Precursor-Lymphom" (englisch: precursor = "Vorläufer") oder reifzellige Lymphome). Zusätzlich werden NHL in langsam proliferierende oder indolente (niedrigmaligne), in schnell proliferierende oder aggressive (hochmaligne) NHL unterteilt.

Weltweit gehören die Lymphome zu den zehn häufigsten malignen Erkrankungen. In Deutschland erkrankten 2012 insgesamt 16.150 Männer und Frauen an einem NHL. Damit steht das NHL bei Männern an neunter und bei Frauen an siebter Stelle der Krebsneuerkrankungen^{22,31}.

Ein NHL kann jede Altersgruppe betreffen. Das durchschnittliche Erkrankungsalter in Deutschland liegt bei Männern bei 72 Jahren, bei Frauen im Alter von 74 Jahren. Eher selten sind Erkrankungen vor dem 45. Lebensjahr^{22,31}. Jedoch können auch Kinder an einem NHL erkranken. Nach Angaben des Deutschen Kinderkrebsregisters in Mainz erkrankten in Deutschland 2014 insgesamt 135 Kinder und Jugendliche unter 18 Jahren (davon 95 Kinder unter 15 Jahren) an einem NHL.

Mit ca. 30 % aller NHL in den westlichen Ländern ist das diffus großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL) das häufigste NHL³². Es macht knapp 80% aller aggressiven Lymphome aus³³. Vor allem durch Lymphadenopathie und B-Symptome wird die Erkrankung auffällig. Ohne Therapie verläuft die Erkrankung rasch tödlich. Durch intensive Immunochemotherapie besteht in der Regel jedoch auch im fortgeschrittenen Stadium ein kuratives Therapieziel³⁴. Die Erstlinientherapie des DLBCL besteht aus einer Immunochemotherapie nach dem R-CHOP Schema. Dieses umfasst eine zytostatische Therapie mit Cyclophosphamid (C), Doxorubicin (H), Vincristin (O) und Prednisolon (P) sowie eine Kombination mit Rituximab (R), einem monoklonalen Antikörper gegen CD20-Antigene gerichtet. Die derzeitige Heilungsrate bei DLBCL liegt bei 60-70%³⁵.

Zur Prognoseeinschätzung von Patienten mit einem aggressiven NHL vor Therapiebeginn wurde der Internationale Prognostische Index (IPI), ein Bewertungssystem auf der Basis klinischer Merkmale, eingeführt. Der Index wird aus fünf Merkmalen, bei Zutreffen mit je einem Punkt, errechnet: Alter über 60 Jahre, schlechter Allgemeinzustand (Grad 2-4 nach der ECOG-Einteilung (ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group)), erhöhte Lactatdehydrogenase (LDH) im Serum, fortgeschrittenes Krankheitsstadium (III und IV entsprechend der Ann-Arbor-Klassifikation) und mehr als ein extralymphatischer Befall. Patienten mit bis zu einem Punkt besitzen ein niedriges, Patienten mit 2 ein

intermediär-niedriges, Patienten mit 3 ein intermediär-hohes und Patienten mit 4 oder 5 Punkten ein hohes Risikoprofil ^{36–38}. Neben dem IPI existiert heute für Patienten unter 60 Jahren ein altersadaptierter Internationaler Prognostischer Index (aaIPI). Dieser Index wird insgesamt nur aus drei der fünf IPI Merkmalen errechnet. Addiert werden die Punkte aus dem Stadium der Erkrankung nach der Ann-Arbor Klassifikation, aus der Höhe des LDH-Wertes und aus dem Allgemeinzustand des Patienten (ECOG-Einteilung).

Internationaler Prognostischer Index (IPI):

- Alter > 60 Jahre
- schlechter Allgemeinzustand (ECOG = 2)
- hohe LDH (> oberer Normalwert)
- Krankheitsstadium III und IV nach Ann-Arbor Klassifikation
- 1 extranodaler Befall

Folgende Risikogruppen werden unterschieden:

- niedriges Risiko: 0 oder 1 Risikofaktor
- niedrig-intermediäres Risiko: 2 Risikofaktoren
- hoch-intermediäres Risiko: 3 Risikofaktoren
- hohes Risiko: 4 oder 5 Risikofaktoren

Ann-Arbor-Klassifikation

TABELLE 1 ANN-ARBOR KLASSIFIKATION ³⁴

Stadium	Definition
I	Nodaler Befall in einer einzigen Lymphknotenregion
Ie	Vorliegen eines einzigen extralymphatischen Lymphknotenherdes
II	Befall mehrerer Lymphknotenregionen auf einer Seite des Zwerchfells
Ile	Vorliegen eines einzigen extralymphatischen Lymphknotenherdes und Befall einer oder mehrerer Lymphknotenregionen auf einer Seite des Zwerchfells
III	Befall von Lymphknotenregionen auf beiden Seiten des Zwerchfells
IIle	Vorliegen eines einzigen extralymphatischen Lymphknotenherdes und Befall einer oder mehrerer Lymphknotenregionen auf beiden Seiten des Zwerchfells
IV	Diffuser Befall eines oder mehrerer extralymphatischer Organe
Suffix S	Befall der Milz
Zusatz A	Keiner der und B angegebenen Allgemeinsymptomen

Zusatz B	Eines oder mehrere der Allgemeinsymptome <ul style="list-style-type: none"> • Fieber >38° C • Nachtschweiß • Gewichtsverlust >10% des Körpergewichtes innerhalb von 6 Monaten
----------	--

Erworbene oder angeborene Immunschwächen (HIV, Medikamente) zählen zu den gesicherten Risikofaktoren für die Entstehung eines Lymphoms. Eine Reaktivierung des Epstein-Barr-Virus kann durch Veränderungen der B-Zell Proliferation und Transformation ebenfalls zu einer Lymphomentstehung führen^{39,40}. Die Liste der wahrscheinlichen oder möglichen Risikofaktoren ist lang und sie wird kontinuierlich erweitert. Besonders berufliche Expositionen mit Schwermetallen oder Chemikalien, wie Herbiziden, werden derzeit untersucht.

1.3 Die Immuntherapie

1.3.1 Immuntherapie mit dem monoklonalen Antikörper Rituximab

Der früheste Nachweis von Antikörpern gelang Emil Behring und Shibasaburo Kitasato 1890. Die Publikation „Über das Zustandekommen der Diphtherieimmunität und der Tetanusimmunität bei Thieren“ gilt bis heute als Grundlage der Serumtherapie und Beginn der passiven Immunisierung^{42,43}. Die Immunologen Georges Köhler und Cesar Milstein entwickelten 1975 ein Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper^{41,42}. Die Hybridom-Technik ermöglichte eine unbegrenzte Anzahl von identischen Antikörpern, die sich gegen ein einzelnes Epitop mit hoher Spezifität richten, zu produzieren.

Monoklonale Antikörper, die der IgG Gruppe entstammen, bestehen aus jeweils zwei identischen leichten und zwei identischen schweren Proteinketten. Durch nichtkovalente Bindung sowie durch Disulfidbrücken der Proteinketten erhält der Antikörper eine Y-förmige Struktur mit insgesamt 3 unabhängigen Bindungsmöglichkeiten: zwei Fab (engl. fragment, antigen binding) und einer Fc (engl. fragment, crystallisable) Region. An den beiden kurzen Stellen des Y-förmigen Immunglobulins befinden sich die Antigenbindungsstellen. An diesen Enden können spezifische Antigene oder Haptene gebunden werden. Das lange Ende des Immunglobulins wird als Fc Fragment bezeichnet und kann an Komplementproteine oder zelluläre Fcγ- Effektor-Rezeptoren binden^{43,44}.

Mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern konnte Lee Nadler als erster spezifische B-Zell Antigenstrukturen wie CD 19, 20, 21 oder 22 nachweisen^{45,46}. Vor allem die Entdeckung des Oberflächenantigens CD20 und die Erkenntnis, dass das CD20 Oberflächenprotein nicht nur auf der Zelloberfläche von gesunden B-Zellen, sondern auch auf maligne entarteten Zellen der B-Zell Reihe exprimiert wird, trug entscheidend zur Verbesserung der Lymphomtherapie bei⁴⁷⁻⁵³.

CD20 ist ein membranständiges nicht-glykosyliertes Phosphoprotein mit einem Gewicht von 33-37 Kilo Dalton. Es besitzt 4 transmembrane Domänen und ein intrazelluläres Amino- und Carboxylende^{54,55}.

An die kleine extrazelluläre Schleife des CD20 Oberflächenproteins kann Rituximab (144 Kilo Dalton, 1328 Aminosäuren), ein biotechnologisch hergestellter chimärer monoklonaler CD20 Antikörper, binden. Rituximab ist ein IgG1 Kappa-Immunglobulin aus 4 variablen Mausdomänen und einer konstanten humanen Domäne. Damit gehört Rituximab zu den chimären Antikörpern⁵⁶. Die Zulassung als erster therapeutischer monoklonaler Antikörper in der Krebsimmuntherapie gegen NHL 1998 in Deutschland veränderte vor allem die Therapie der B-Zell Lymphome⁴⁵⁻⁴⁷.

Vose et al. konnten 2001 in einer der ersten Studien eine positive Wirkung von Rituximab auf die Therapie beim DLBCL nachweisen. In einer weiteren randomisierten Studie konnten Coiffier et al. einen Zusatznutzen von Rituximab in Kombination mit einer Zytostatikatherapie bei älteren Patienten zwischen 60 – 80 Jahren mit DLBCL bestätigen. In dieser Studie wurden die Patienten mit neudiagnostizierten unbehandelten DLBCL in zwei Studienarme randomisiert. Ein Arm erhielt 8-Zyklen CHOP-Chemotherapie alle 21 Tage (CHOP-21), der andere Studienarm erhielt eine CHOP-Therapie mit Rituximab alle 21 Tage (R-CHOP-21). Es zeigte sich nicht nur eine Steigerung der kompletten Remissionsrate durch Rituximab (76% vs. 63%, $p=0,005$), sondern auch ein signifikant besseres ereignisfreies Überleben (57% vs. 38%, $p<0,001$) und ein signifikant gesteigertes Gesamtüberleben (70% vs. 57%, $p=0,007$) nach 2 Jahren Beobachtungszeit^{48,57-59}. Das Risiko eines Therapieversagens war durch die Erweiterung der CHOP-Therapie mit Rituximab signifikant verringert worden (Risiko-Ratio, 0,58 [95 % Konfidenzintervall, 0,44 - 0,77]. Nebenwirkungen waren durch die Addition des monoklonalen Antikörpers zur CHOP-Therapie nicht signifikant erhöht.

Pfreundschuh et al. konnten in einer großen prospektiv randomisierten Studie (RICOVER-60) ebenso verbesserte Therapieergebnisse durch eine Kombinationstherapie mit Rituximab erreichen. In dieser Studie wurden die Studienarme der CHOP und der R-CHOP Therapie nochmals in je eine Gruppe mit 6 und 8 Therapiezyklen unterteilt. Die Studie ergab eine bevorzugte Therapieempfehlung für ältere Patienten (Alter: 61 – 80) für 6 Zyklen CHOP-14 und 8 Zyklen Rituximabtherapie. Es zeigte sich eine signifikante Verbesserung für das ereignisfreie, das progressionsfreie als auch für das Gesamtüberleben für ältere Patienten mit einem neudiagnostizierten unbehandelten aggressiven B-Zell-Lymphom⁵².

In der MINT-Studie (**M**abThera **I**nternational **T**rial Gruppe) wurden ähnliche Ergebnisse mit insgesamt 823 Patienten im Alter zwischen 18 - 60 Jahren mit einem low-risk DLBCL nach 6 Zyklen CHOP bzw. R-CHOP Therapie ermittelt. Nach einer Beobachtungszeit von durchschnittlich 34 Monaten zeigten Patientin mit zusätzlicher Rituximabtherapie ein signifikant verbessertes 3-Jahres-ereignisfreies Überleben im Vergleich zur Therapiegruppe mit alleiniger Chemotherapie ohne Rituximab (79 % [95 % CI 75 - 83] vs. 59 % [54 - 64]). Zusätzlich zeigte die R-CHOP-Therapiegruppe ein erhöhtes 3-Jahres-Gesamtüberleben (93 % [90 - 95] vs. 84 % [80 - 88]). Das ereignisfreie Überleben wurde vor allem durch das Stadium der Erkrankung (aaIPI-Index) als auch durch das Vorliegen von einer Bulk-Beteiligung zu

Gunsten der Subgruppe mit aalPI von 0 und keiner Bulk-Beteiligung (bei einem Bulk handelt es sich um einen Lymphomherd mit großer Ausdehnung) beeinflusst ⁵¹.

Habermann et al. Randomisierten 632 ältere DLBCL Patienten (> 60 Jahre) in eine R-CHOP und in eine CHOP Studiengruppe. Zusätzlich wurden die Gruppen in einen Studienarm mit und ohne Rituximab Erhaltungstherapie nach Immunochemotherapie unterteilt. Eine Zusätzliche Erhaltungstherapie nach vorausgegangener R-CHOP Therapie zeigte keinen zusätzlichen Effekt ⁵⁰. Die Kombinationstherapie nach R-CHOP Schema ohne Erhaltungstherapie gilt heute als Standardtherapie für DLBCL ⁵⁹.

TABELLE 2 STUDIEN ZUM THERAPIEVERGLEICH VON R-CHOP VS. CHOP BEI BISHER UNBEHANDELTEN PATIENTEN MIT DLBCL ZEIGEN VERBESSERTE THERAPIEERGEBNISSE NACH EINER KOMBINATIONSTHERAPIE MIT RITUXIMAB

Studie von	Jahr	Patienten	Therapie-Regime	3-Jahres Follow Up Ereignisfreies-Überleben	Overall Survival (OS)
Coiffier (Coiffier <i>et al.</i> , 2002)	2002	DLBCL 60-80 Jahre N= 399	R-CHOP-21	57%	70%
			CHOP	38%	57%
Pfreundschuh (Pfreundschuh <i>et al.</i> , 2006)	2006	Low risk DLBCL 18-60 Jahre N= 824	R-CHOP ähnliche Chemotherapie	79%	93%
			CHOP ähnliche Chemotherapie	59%	84%
Pfreundschuh (Pfreundschuh <i>et al.</i> , 2008)	2008	DLBCL 61-80 Jahre N: 1222 RICOVER-60	R-CHOP-14 6 Zyklen 8 Zyklen	78 % 73 %	78 % 73 %
			CHOP-14 6 Zyklen 8 Zyklen	68 % 66 %	67 % 66 %

Jahr: Jahr der Veröffentlichung; eine mögliche Ursache für die kleineren Werte der Follow-Up Ergebnisse der Habermann-Studie könnten niedrigere Dosisgaben von Rituximab sein ⁶⁰, Overall Survival: Gesamtüberleben nach 5 Jahren.

1.3.2 Wirkmechanismus von Rituximab

Die Wirkung der Rituximab Therapie wird vor allem durch eine antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC = antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) induziert. Weitere Effektorwege sind die komplementabhängige Zytolyse (CDC = complement-dependent cytotoxicity) und die direkte zelluläre Zytotoxizität über die CD20 Zellsignalleitung^{61,62}. Die Effektormechanismen werden in den nächsten Abschnitten der Arbeit genauer beschrieben.

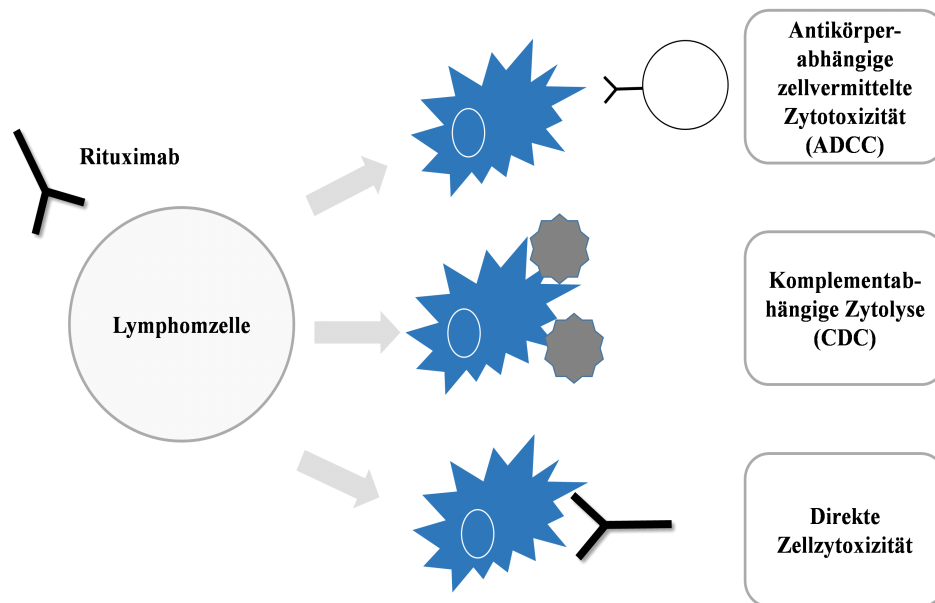


ABBILDUNG 2 VERSCHIEDENE HAUPTEFFEKTORWEGE VON RITUXIMAB. ANGELEHNT AN DEUTSCHE LEUKÄMIE- & LYMPHOMHILFE, 2016

1.3.3 Die antikörperabhängige Zytotoxizität

Die ADCC ist ein immunologischer Mechanismus über den eine Antikörper-gebundene Zielzelle durch Effektorzellen des Immunsystems eliminiert wird. Der Abwehrmechanismus setzt sich insgesamt aus drei Komponenten zusammen: aus einer Zielzelle, aus einer Effektorzelle, welche im Verlauf des Abwehrmechanismus die Zielzelle eliminiert und aus einer dritten Komponente, dem Antikörper, welcher den Lyse-/Apoptosemechanismus induziert.

An der ADCC sind als Effektorzellen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen beteiligt. Der Haupteffekt des Mechanismus wird von NK-Zellen bewältigt⁶³. Ca. 5-15% der zirkulierenden Lymphozyten sind NK-Zellen. Eine Besonderheit der NK-Zelle ist, dass sie im Gegensatz zu anderen Zellen kontinuierlich Perforine und Granzyme produziert, diese intrazellulär in Vesikeln speichert und so bei Aktivierung jederzeit eine Immunantwort auslösen kann⁶⁴. NK-Zellen können eine Zielzelle auf zwei Wegen erkennen. Bindet eine NK-Zelle an ein MHC I Oberflächenmolekül auf einer Zielzelle wird ein inhibitorisches Signal in die NK-Zelle geleitet und die NK-Zelle bleibt inaktiv. Fehlt dieses Protein

oder ist es nur fehlerhaft ausgebildet (z.B. auf Tumorzellen), erkennt eine NK-Zelle, dass das inhibitorische Signal fehlt und die NK-Zelle wird aktiviert (sog. „missing-self“-Hypothese)⁶⁵. Ein zweiter Effektorweg von NK-Zellen wird über Fcγ-Rezeptoren vermittelt. Über diese Rezeptoren erkennen NK-Zellen solche Zellen, an die ein IgG Molekül, zum Beispiel Rituximab, gebunden hat. Insgesamt werden drei verschiedene Fcγ Rezeptoren auf Effektorzellen mit unterschiedlicher Affinität zum IgG Antikörper unterschieden: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) sowie FcγRIII (CD16)⁶⁶. NK-Zellen besitzen vor allem FcγRIII Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. Über diese Rezeptoren werden verschiedene Signale in die NK-Zelle transduziert.

Membranständige Rezeptoren können unterschiedliche sowohl aktivierende (CD16, CD64; ITAM: immunoreceptor tyrosinbased activation motif) als auch inhibierende (CD32; ITIM: immunoreceptor tyrosinbased inhibitory motif) intrazelluläre Signale induzieren und so einen Einfluss auf Effektor- und Zielzellen nehmen^{63,67}. Wird das Gleichgewicht der Signale verschoben und kommen mehr aktivierende als inhibierende Signale in der Zelle an, wird die NK-Zelle aktiviert. Die Zelle schüttet Perforine aus, welche Löcher in die Plasmamembran der Zielzellen „bohren“. Weiter kommt es zur Ausschüttung von Granzymen, zu einer Stimulierung von Tumornekrosefaktor-Rezeptoren (TNF Death Rezeptor) sowie zu einer vermehrten Produktion von Interferon-γ (IFNγ). Ein programmierter Zelltod - die Apoptose - wird eingeleitet. Zusätzlich werden durch IFNγ weitere Immunzellen wie Makrophagen oder zytotoxische T-Zellen angelockt⁶⁸. Die ADCC nutzt damit Zellen sowohl aus dem angeborenen als auch aus dem adaptiven Immunsystem und stellt eine Verbindung beider Systeme her^{68,69}.

Der „aktivierende“ FcγRIIIa (CD16) Rezeptor wird vor allem auf NK-Zellen exprimiert. Ein Dimorphismus des Rezeptors an Position 158 mit der Aminosäure Valin (V158) oder Phenylalanin (F158) ist bekannt und beeinflusst die Quantität und die Qualität der ADCC. Der Rezeptor mit Valin hat eine höhere Affinität zum IgG1 Antikörper⁶⁹. Es wird vermutet, dass der Rezeptor V158 aufgrund seiner höheren Affinität eine stärkere ADCC induziert⁷⁰. In einer kleinen Gruppe von Patienten mit follikulärem Lymphom (malignes Lymphom aus der Gruppe der NHL) konnte gezeigt werden, dass die Ansprechrate und die komplette Remission nach einer Rituximab Therapie bei 10 von 49 Patienten mit einem homozygoten V158 Rezeptor höher als bei Patienten mit einem homo- oder heterozygoten Phenylalanin P158 Rezeptor war⁷⁰. Eine Ursache für die geringere Ansprechrate und Wirkung der Rituximabtherapie wird im Rezeptorpolymorphismus für die ADCC durch Rituximab vermutet⁶².

Ein weiterer Aspekt von NK-Zellen in der Induktion der ADCC ist, dass sie im Gegensatz zu anderen Zellen keinen inhibitorischen FcγRIIB Rezeptor exprimieren. Demzufolge überwiegt nach Bindung von Antikörpern an Rezeptoren das „aktivierende“ Signal und die NK-Zelle kann effektiv aktiviert werden. Ravetch et al. zeigten, dass bei Knockout-Mäusen mit fehlenden inhibitorischen FcγRIIB Rezeptoren

auf anderen Effektorzellen des Immunsystems, dass durch das Knockout des Rezeptors eine stärkere ADCC zu messen war ⁶⁶.

Bei Knockout-Mäusen ohne oder mit veränderten Fcγ Rezeptoren (FcγRI und FcγRIII), welche eine überwiegend aktivierende Wirkung auf Effektorzellen haben, wurde mit einer Rituximab-Immunotherapie weder das Tumorwachstum effektiv unterbunden noch die Zelle in den Zellarrest geführt. Auch ein veränderter Antikörper mit gehemmter Fc-Bindungsmöglichkeit an Effektorzellen zeigte eine ähnlich reduzierte Wirkung der Immunotherapie und eine verminderte Effektivität der ADCC ⁶⁶. Eine ausgeglichene Balance zwischen inhibierenden und aktivierenden Fcγ Rezeptoren scheint, zumindest in Mausmodellen, eine wichtige Rolle für die ADCC sowie eine „Kontrolle“ auf Zellen zu haben ⁶⁹.

Obwohl verschiedene Fc Rezeptor-abhängige Funktionen bekannt sind, ist ihre spezifische Rolle in vivo bis heute nur bedingt erklärt. Ein Problem ist, dass sich verschiedene FcR Expressionsmuster überlappen und verschiedene Mechanismen wie die CDC von der ADCC in vivo nur schwer zu differenzieren sind. Durch Knockout-Mäuse mit verschiedenen Fc-Anteilen soll der genaue Mechanismus in Zukunft weiter verstanden werden.

Der ADCC steht die CDC als ein weiterer Rituximab-Effektorweg gegenüber. Im Gegensatz zur ADCC benötigt die CDC keine Effektorzellen, sondern führt durch Aktivierung des Komplementsystems zur Zerstörung der Zielzelle ^{43,71}.

1.3.4 Die komplementabhängige Zytotoxizität (CDC)

Das Komplementsystem führt über eine proteinvermittelte Kaskade zu einer komplementabhängigen Lyse von Zielzellen ⁷². Komplementproteine, welche die Kaskade benötigt, werden in der Leber als Zymogene –als inaktive Enzymvorstufen- gebildet und sind bei Bedarf in der Regel ausreichend im Serum vorhanden. Neben dem vom Rituximab ausgelösten „klassischen“ Aktivierungsweg des Komplementsystems über Antikörper und Antigen sind zwei weitere Möglichkeiten bekannt die das Komplementsystem starten (Lektin-Weg und der sog. Alternative Weg).

Bindet ein Antikörper an eine Zielzelle, kommt es zur Konformationsänderung der CH2-Domäne der konstanten Region des Fc-Teils des Antikörpers und dadurch zu einer Bindungsmöglichkeit des ersten Komplementproteins C1. Durch Bindung des Antikörpers und des C1 Komplementproteins wird eine Serin-Threonin Protease (C1s), welche an das C1 Komplementprotein gebunden ist, aktiviert. Die Aktivierung einer Protease führt zur Spaltung nächster Proteine der Komplementkaskade und aktiviert dadurch die nächste Protease. Es entsteht eine sich selbst verstärkende proteolytische Kaskade ¹⁴.

C1s aktiviert die Spaltung der Komplementproteine C2 und C4. Die Spaltprodukte C2a und C4b lagern sich zu einem C4b2a-Komplex zusammen und bilden eine C3 Konvertase. Die über die C3-Konvertase entstandenen C3 Spaltprodukte aktivieren weitere Proteine, haben aber auch die Möglichkeit als Anaphylotoxin zu fungieren oder als Lockstoff weitere Immunzellen zu rekrutieren, die die Komplementkaskade „komplementieren“^{14,72}.

Ein Komplementkomplex aus den Spaltprodukten C4b, 2a und 3b aktiviert eine C5 Konvertase. Spaltprodukte der C5 Konvertase haben eine ähnliche Wirkung wie die Spaltprodukte des Faktors C3, leiten aber zusätzlich noch die Bildung des Membranangriffkomplexes (MAC) ein. Aus den Faktoren C5b, C6, C7, C8 und mehreren C9 Faktoren setzt sich ein aktiver MAC zusammen (C5b678poly9-Komplex). Dieser Komplex kann Poren in die Zellmembranen „bohren“ und zur Lyse der Zielzelle führen^{14,44,72}. Über die Aktivierung des Komplementsystems hat Rituximab einen Einfluss auf die Lyse und Zerstörung der Zielzelle^{73,74}. Ein Verbrauch von Komplementfaktoren während einer Rituximab Therapie konnten von Kennedy et al. gezeigt werden⁷⁵.

Verschiedene Studien konnten die Wirkung von monoklonalen Antikörpern über Komplementkomponenten auf Tumorzellen in vitro beweisen. Die Frage, wie hoch die Effektivität der CDC in vivo ist, blieb bisher jedoch ungeklärt⁷². Interessant ist, dass verschiedene Tumoren, auch NHL, eigene komplementregulierende Proteine (CRP) wie CD55, CD46 und CD59 exprimieren, Komplementproteine über diese neutralisieren und dadurch die Produktion von MACs auf Zielzellen unterbinden können^{72,76}. Es wird vermutet, dass die vermehrte Expression solcher Proteine in Tumoren zu einer verminderten Wirkung von Rituximab in vivo beiträgt^{72,77}.

Treon et al. beschreiben, dass eine vermehrte Expression von CRPs nach Rituximab-Therapie bei rezidivierenden Tumorzellen nachzuweisen sind⁷⁸. Macor et al. zeigten, dass bei Mäusen mit einer CD55 und CD59 Blockade eine gesteigerte Rituximab-Wirkung gemessen werden konnte. Eine Blockade dieser Proteine könnte eine Möglichkeit sein, die CDC zu verstärken und eine verstärkte therapeutische Wirkung durch Rituximab zu erhalten⁷⁶.

1.3.5 CD 20 als direktes intrazelluläres Signal

Das CD20 Antigen hat einen direkten Einfluss auf die Regulation von Zellwachstum, auf die Differenzierung als auch auf die Proliferation der B-Lymphozyten^{54,61}. Es ist ein regulierender Kalziumkanal („store-operated channel“ SOC) in der Plasmamembran^{79,80}. Durch Bindung eines CD20 Antikörpers kommt es zur Aktivierung von Serin/Tyrosin- und Tyrosinkinasen⁵⁴. Diese führt zur Tyrosinphosphorylierung intrazellulärer Proteine wie der Phospholipase C, zu einer Ausschüttung intrazellulärer Kalziumspeicher in das endoplasmatische Retikulum und zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration. CD20 als Kalziumtransporter füllt die leeren Kalziumspeicher wieder auf. Dies kann unter anderem zu einer Steigerung der Expression des B-Zell Rezeptors führen⁸¹.

Ein weiterer direkter CD20-Signalweg von B-Zellen sind sogenannte Lipid-Rafts (engl. Lipid-Flöße)⁶². Lipid-Rafts sind cholesterin- und sphingolipidhaltige Zellmembran-Mikrodomänen, die an verschiedenen Prozessen, zum Beispiel an Signaltransduktionen in der Zelle oder an Prozessen im Golgi-Apparat beteiligt sind. Durch Bindung eines Antikörpers an eine CD20-Oberflächenstruktur kann es zu Umverteilungen von Lipid-Rafts-Strukturen an speziellen Domänen der Plasmamembran kommen. Diese kann zu einer transmembranen Signaltransduktion führen und die Aktivität von Ionen-Pumpen und Ionen-Kanälen beeinflussen^{80,82-84}. Boyd et al. konnten einen Einfluss von Lipid-Rafts durch Runterregulation wichtiger Signaltransduktions-Lipid-Rafts (raftlin & Cbp/PAG) in der Plasmamembran bei NHL zeigen⁸⁵. Es wird vermutet, dass dieses zu einer verminderten Zell-Signalleitung führt und eine Rolle in der Lymphompathologie spielt⁸⁴.

CD20-Knockout-Mäuse (CD20^{-/-}) präsentieren jedoch keinen prominenten Phänotyp und eine überwiegend normale Entwicklung von Vorläufer- und reifen B-Zellen, welches die Frage nach der genauen Funktion von CD20 ungeklärt lässt⁵⁴.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass, obwohl bisher nur wenig über die direkte Signalleitung und die Funktion von CD20 Oberflächenmolekülen bekannt ist, CD20 Antikörper über verschiedene Möglichkeiten neoplastische B-Zellen beeinflussen können - unabhängig von der bisher beschriebenen ADCC oder CDC^{83,86}.

1.4 Cathelicidin

1.4.1 Das antimikrobielle Peptid Cathelicidin

NK-Zellen als eine Komponente des angeborenen Immunsystems spielen eine entscheidende Rolle in der Tumorüberwachung wie z.B. in Melanome oder in Lymphomen⁸⁷. Den Einfluss von aktiven NK-Zellen in der Tumorüberwachung kann in Perforin-Knockout-Mäusen gezeigt werden. Knockout-Mäuse mit gezielter Deletion der Perforinproduktion in NK-Zellen sind zum Beispiel anfälliger für Infektionen, zeigten vermehrt aggressive Lymphome oder können transplantierte Tumoren nur eingeschränkt abstoßen^{87,88}.

Interessanterweise konnten in NK-Zellen nicht nur Perforine oder Granzyme, sondern auch Cathelicidin nachgewiesen werden. Büchner et al. zeigten, dass Cathelicidin vor allem zu messen war wenn NK-Zellen lokalisiert waren⁸⁷.

Cathelicidin gehört zur Familie der antimikrobiellen Peptide. Das Gen für Cathelicidin (murines Camp/ humanes CAMP) befindet sich auf Chromosom 3 und codiert ein Präpropeptid. Das Propeptid von Cathelicidin wird in verschiedenen Zellen wie in neutrophilen Granulozyten, Mastzellen und NK-Zellen kontinuierlich produziert und intrazellulär in zytoplasmatischen Granula gespeichert. Weitere Zellen, in denen Cathelicidin nachgewiesen werden konnte, sind Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen⁸⁹.

Cathelicidin besteht aus 37 Aminosäuren (AS) und 2 Leucin AS am Anfang des Peptides (namensgebend: LL37) und kann in aktiver Form eine schnelle und starke Wirkung auf Zielzellen einleiten⁹⁰. Cathelicidin LL-37 ist das bisher einzige bekannte humane Cathelicidin⁸⁷.

Nach Ausschüttung und Aktivierung von Cathelicidin kann es durch eine Anlagerung mehrerer Cathelicidinpeptide an die Plasmamembran der Zielzelle zur Perforation der Membran, zu einem Efflux wichtiger intrazellulärer Ionen und Nährstoffe kommen und somit die Zerstörung der Zielzelle induziert werden⁹¹. Ein anderer oder auch komplementärer Effektweg von Cathelicidin verläuft intrazellulär durch Beeinflussung der Expression von Proteinen wie Perforinen, bcl-2 oder Granzymen oder durch eine veränderte Ribosomenfunktion^{92,93}.

In-Vitro-Untersuchungen zeigten, dass synthetisches oder humanes Cathelicidin einen Einfluss auf Tumorwachstum hat. In Knockout-Mäusen mit gezielter Deletion vom Cathelicidin-Gen (Camp -/-) konnte ein schnelleres Tumorwachstum als in Wildtyp Mäusen gezeigt werden. Durch eine erhöhte Konzentration von Cathelicidin konnte Tumorzellproliferation inhibiert und eine vermehrte Zytotoxizität induziert werden⁸⁷.

Weitere Untersuchungen in-vitro haben gezeigt, dass in Lymphomgewebe bei Camp -/- Mäusen eine verminderte zytotoxische Aktivität gemessen werden kann. Eine in Camp -/- Mäusen verminderte Perforinproduktion durch defekte Perforinexpression oder eine veränderte NK-Zell-Degranulation als Ursache der reduzierten Zytotoxizität konnten nicht nachgewiesen werden. Es wird davon ausgegangen, dass Cathelicidin an einer optimalen NK-Funktion sowie an einer vollständigen NK-

Zytotoxizität beteiligt ist und eine bisher noch unentdeckte direkte Rolle in der NK-Zytotoxizität spielt⁸⁷. Regulationsmechanismen der Cathelicidin-Expression in einer Zelle scheinen komplex, je nach Zell- und Gewebetyp, reguliert zu sein.

1.4.2 Cathelicidin-Expression

Die Entdeckung einer Vitamin-D-Response-Element-Sequenz (VDRE-Sequenz) in der Promotorregion des Cathelicidin-Gens brachte einen entscheidenden Hinweis auf eine Vitamin-D-abhängige Transkriptionskontrolle von Cathelicidin⁹⁴.

Vitamin-D-Rezeptoren (VDR) bestehen aus 427 Aminosäuren und gehören zur Familie der Steroidrezeptoren. Lopes et al. zeigten, dass die Anzahl der VDR in verschiedenen Tumorgeweben variiert. VDR waren in gutartigen Brustgewebsläsionen zu über 90% exprimiert, in invasiven Tumoren jedoch nur zu 56%. Eine unterschiedliche Expression von Polypeptiden wie CYP24A1 oder CYP27B1, welche die Konzentration und Aktivität von Vitamin-D beeinflussen, sind ebenfalls in verschiedenen Konzentrationen in unterschiedlichen Tumoren zu messen⁹⁵. Ein Vitamin-D-Mangel konnte in Studien mit einem reduzierten EFS sowie OS bei Patienten mit aggressivem NHL und Rituximab Therapie gezeigt werden. Die Rolle der Vitamin-D-Konzentration in der Rituximab-abhängigen-CDC wird derzeit diskutiert²⁵.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Cathelicidin nach derzeitigem Wissen eine Rolle in der NK-Zell-Funktion sowie in tumoralen Abläufen spielt. Aufgrund der Vitamin-D-abhängigen Expression von Cathelicidin und der Tatsache, dass eine adäquate Vitamin-D-Konzentration einen positiven Einfluss auf die Therapie verschiedener Tumore haben könnte, wird untersucht, ob Cathelicidin ein Effektormolekül für Therapien bei verschiedenen Tumoren sein könnte.

2 Hypothese und Fragestellung

Aktuelle Forschungen zeigen, dass Vitamin-D einen Einfluss auf die Prognose und das ereignisfreie Überleben von aggressiven NHL (DLBCL) hat ²⁵. Die Standardtherapie bei aggressiven Lymphomen besteht aus einer Immunochemotherapie nach R-CHOP Schema. Rituximab bindet an Rezeptoren CD20 positiver B-Zellen. Effektorzellen werden durch den Antikörper aktiviert und leiten eine Elimination der Zielzelle ein. Eine Haupteffektorzelle der durch Rituximab ausgelösten ADCC ist die NK-Zelle. NK-Zellen produzieren und speichern zusammen mit anderen Immunzellen das humane antimikrobielle Peptid Cathelicidin. Nach Aktivierung der NK-Zelle wird das neben Granzymen und Perforinen gespeicherte Propeptid von Cathelicidin ausgeschüttet und lokal aktiviert.

Die Hypothese der Arbeit ist, dass die Anzahl der durch Rituximab aktivierten Effektorzellen – in der ADCC vor allem NK-Zellen – in Zusammenhang mit der Menge des aus Granula freigesetzten Cathelicidins steht.

Um zu überprüfen, ob Cathelicidin ein Marker für die durch Rituximab ausgelöste ADCC sein kann, wurde aus seriellen Serumproben zu verschiedenen Zeitpunkten einer R-CHOP Therapie bei aggressiven B-Zell-Lymphomen die Cathelicidinkonzentration gemessen.

In dieser Arbeit wurden Serumproben von Patienten, welche eine Chemotherapie entweder in einem 14 oder 21-tägigen Abstand erhielten, untersucht. Die Variable der Untersuchung bestand in dem Zeitabstand der infundierten Immunotherapie mit Rituximab. 8 Patienten erhielten eine Immunotherapie mit Rituximabgabe an Tag 1, 4, 8, 15, 22, 29 sowie 43 (Dense-R-CHOP), eine zweite Gruppe erhielt eine Immunochemotherapie nach Therapiestandard an Tag 1, 15, 29 und 43.

Zusätzlich wurde die Vitamin-D-Konzentration, die die Transkription von Cathelicidin reguliert und so einen Einfluss auf die produzierte Cathelicidinmenge hat, in den Serumproben an Tag 1 der Therapie gemessen. Eine Korrelation zwischen gemessener Vitamin-D-Konzentration und Cathelicidinkonzentration am Anfang der Therapie sowie während der Therapie wurde überprüft. Ein solcher Nachweis könnte ein Hinweis auf den Mechanismus der Vitamin D Wirkung sein, und eine Therapiekontrolle ermöglichen.

Vitamin-D und die Menge der gemessenen Cathelicidinkonzentration könnten weitblickend als prognostischer Marker in der Therapie aggressiver B-Zell NHL verwendet werden.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung folgender Fragestellungen:

- Lässt sich während des Therapieverlaufs eine steigende/lineare/abfallende Cathelicidinkonzentration nachweisen, welche als Marker für die Aktivierung der ADCC durch Rituximab bei Patienten mit aggressiven B-Zell Lymphom fungieren könnte?
- Existiert ein Zusammenhang zwischen den in dieser Arbeit gemessenen Cathelicidin- und Vitamin-D-Konzentrationen und der Studiendaten der Patienten?
- Besteht eine Korrelation zwischen der Startkonzentration bzw. dem Konzentrationsverlauf von Cathelicidin während der Therapie und der gemessenen Vitamin-D-Konzentration an Tag 1 der Therapie?

3 Material und Methodik

3.1 Verzeichnis verwendeter Materialien

3.1.1 Geräte

Gefrierschrank - 80 C°	Heraeus HeraFreeze HFU 686 Basic Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kühlschrank	Liebherr GmbH, Ochsenhausen Deutschland
Pipetten (1 ml, 0,1 ml)	Eppendorf Reference® 2, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe	Eppendorf Easytip®, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Stripette (10 ml)	Corning® Costar® Stripette® serological pipettes, Sigma-Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten
Vortexer	Vortex-Genie, Scientific Industries, Inc., New York, Vereinigte Staaten
Plattenlesegerät Wallac 450nm	Wallac Distribution GmbH, Freiburg, Dtl.
Werkbank	Sicherheitswerkbank, HERAEUS Group, Hanau, Deutschland

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Mikrotiterplatte	Nunc™ MicroWell™ 96-Well Mikrotiterplatten, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
Pipettenspitzen (1 ml, 0,1 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht Deutschland
Wasseraufbereiter Millipore	Milli-Q® Rein, Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland
Polypropylene Tubes 1 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Polypropylene Tubes 0,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Laborglasflaschen (0,5 l, 1 l)	DURAN® Laborflasche, DURAN Group GmbH, Wertheim, Deutschland
Polypropylene Tubes (Gefrierschrank)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht Deutschland
Aluminiumfolie	Profissimo, Aluminiumfolie, DM Karlsruhe, Deutschland

3.1.3 Chemikalien, Zusammensetzungen (Kits)

Human LL-37, HK 321	Hycult biotec, Uden, NL
Wasch- und Pufferlösung A x20, 60 ml	Hycult biotec, Uden, NL
Wasch- und Pufferlösung B x40, 30 ml	Hycult biotec, Uden, NL
Standard, lyophilized	Hycult biotec, Uden, NL
Tracer, biotiniliert, 1 ml lyophilized	Hycult biotec, Uden, NL
Streptavidin-peroxidase x100, 0,25 ml in solution	Hycult biotec, Uden, NL
Tetramethylbenzidin Substrat, 11 ml	Hycult biotec, Uden, NL
STOP Lösung (oxalsäurehaltig), 22 ml	Hycult biotec, Uden, NL
12 Microtiter strips, pre-coated, 1 plate	Hycult biotec, Uden, NL

3.1.4 Hard- und Software

IBM SPSS Statistics Version 23	IBM Corp. 1989, 2013, Redmond, Vereinigte Staaten
Excel Office	Excel Office Version 2016, Microsoft Corporation, Redmond, Vereinigte Staaten
Word Office	Word Office Version 2016, Microsoft Corporation, Redmond, Vereinigte Staaten
Vitamin-D-Messung	DiaSorin© Chemolumineszenz-Assay, Saluggia, Italien
Perkin Elmer Wallac Victor Microplate Reader	GMI, Minnesota, USA

3.2 Studiengruppe DSHNHL

Die Deutsche Studiengruppe hochmaligner NHL (DSHNHL) ist ein Zusammenschluss von Ärzten und Wissenschaftlern, die unter der Leitung von Prof. Dr. M. Pfreundschuh (Homburg) seit 1993 gemeinsam klinische und wissenschaftliche Studien koordiniert und durchführt. Zusätzlich archiviert die DSHNHL Serum- als auch Blutproben zentral in Homburg/Saar (Universitätsklinikum des Saarlandes, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, Homburg/Saar, Deutschland). Die patientenspezifischen Daten werden zentral durch die DSHNHL in Homburg/Saar verwaltet. Die in Homburg archivierten Patientenproben stellen eine einmalige Biobank von Patienten mit aggressiven Lymphomen dar. Die ebenfalls zugänglichen klinischen Daten vor Ort ermöglichten die Durchführung dieser Arbeit. Durch prospektiv randomisierte klinische Studien wird eine Verbesserung der Therapien sowie deren Nebenwirkungen erreicht und neue internationale Standardtherapien konzipiert. Diese

Studien haben zum Ziel die Qualität der Therapien sowie die Lebensdauer und -qualität von Lymphompatienten zu verbessern.

Seit 1994 wird die Studiengruppe von der Deutschen Krebshilfe unterstützt und verfügt über Zentren am Universitätsklinikum des Saarlandes in Homburg (Saar), der Asklepios-Klinik St. Georg in Hamburg und am Universitätsklinikum Göttingen.

3.3 Serumproben

Für diese Arbeit wurden Serumproben aus verschiedenen prospektiv kontrollierten Studien der DSHNHL verwendet, die uns freundlicherweise von der Studienzentrale Homburg zur Verfügung gestellt wurden. Die Studien wurden genehmigt von der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes. Entsprechend der Erklärung von Helsinki lagen jeweils die schriftlichen Einverständniserklärungen der Studienteilnehmer vor Studienbeginn vor.

Die Studienkollektive dieser Arbeit bestanden aus männlichen und weiblichen Patienten mit einem bisher unbehandelten CD20-positiven aggressiven B-Zell NHL im Alter von 18 bis 60 Jahren bzw. 61 bis 80 Jahren. Ein- bzw. Ausschlusskriterien der Studien sind im Folgenden gelistet:

Einschlusskriterien:

- CD20- positives B-Zell NHL, Histologie: Diagnose gesichert durch eine Exzisionsbiopsie eines Lymphknotens oder durch eine Biopsie eines extranodalen Befalls (wenn kein Lymphknotenbefall vorlag)
- Alle Risikogruppen (IPI, aalPI I-V)
- Allgemeinzustand zum Zeitpunkt der Randomisation: ECOG: 0 – 2, Karnofsky 60-100% ^{97,98}
- Schriftliche Einverständniserklärung des Patienten
- Teilnahmeerklärung des Studienzentrums

Ausschlusskriterien:

- Bereits begonnene Therapie des Lymphoms
- Schwere Begleiterkrankungen oder verminderte Organfunktion:
 - Kardio: Angina pectoris (CCS >2), Herzinsuffizienz (NYHA >2), kardiale Ejektionsfraktion < 50%, kardiale fraktionelle Faserverkürzung <25%
 - Nierenfunktion: Kreatinin > 2-fache des Normwertes
 - Leberfunktion: Bilirubin > 2-fache des Normwertes

- Pulmo: verminderte Lungenfunktion mit einer FeV1 < 50% des Normwertes und/oder eine verminderte Diffusionskapazität < 50% des Normwertes
- Nicht einstellbarer Diabetes mellitus
- Thrombozytopenie < 100.000 / μ l, Leukozytopenie < 2.500 / μ l
- HIV-Positivität
- Aktive Hepatitis-Infektion
- Überempfindlichkeit gegenüber der verwendeten Medikation
- Knochenmarkbefall > 25%
- Bereits stattgefundene Chemo- oder Strahlentherapie einer früheren Erkrankung
- Bekannte Zweitneoplasie oder bereits Teilnahme an einer anderen Therapiestudie
- Auf das ZNS-beschränkte Lymphome
- Gastrointestinale Lymphome
- Reduzierte Patienten-Compliance

Als Beobachtungseinheit in dieser Arbeit wurden Serumproben der Studien an Therapietag 1, 15, 29 und Tag 43 verwendet. Aus Studienlisten (CHOP-R-esc/ Dense-R-UP- 14, UNFOLDER, RICOVER 60, PEGfilgastrim) wurden 15 Patienten, welchen während der Therapie bis zu 21 Serumproben zu verschiedenen Zeitpunkten der Therapie entnommen wurden, herausgefiltert, deren Proben an Tag 1, 15, 29 und 42 jeweils 30 Minuten vor Therapiebeginn entnommen und gesammelt wurden. Aus verschiedenen Blutproben-Sammelboxen wurden die ausgewählten Proben herausgesucht und chronologisch sortiert. Die Cathelicidinkonzentration wurde aus jeder Probe gemessen. Zusätzlich wurde aus den Serumproben von Tag 1 30 Minuten vor Therapie die Vitamin-D-Konzentration gemessen.

Insgesamt wurden 60 Proben ausgewertet: 32 Proben aus der CHOP-R-esc Studie/ Dense-R-UP-CHOP-14, 12 Proben aus der RICOVER-60 Studie und 16 Proben aus der UNFOLDER 21/14 Studie.

3.3.1 Serumproben aus der CHOP-R-esc/ Dense-R-Up-CHOP-14 Studie

In der Studie wurden Patienten mit aggressivem CD20-positivem B-Zell Lymphom im Alter von 61-80 Jahren behandelt. Die Studie beinhaltete eine Chemotherapie nach dem R-CHOP Schema mit insgesamt sechs Zyklen und zwei zusätzlichen Rituximabgaben (6x R-CHOP-14 + 2x Rituximab). Eine

zweite Studiengruppe erhielt die Rituximab Therapie in einer zeitlich intensivierten Abfolge (Dense-R-Up-CHOP) mit 2-maliger Gabe vor der ersten Chemotherapie an Tag -1 und Tag 0, sowie an Tag 3, 7, 14, 21, 28, und 42 nach der ersten Chemotherapie. Die untersuchten Proben der Patienten gehörten der Gruppe der zeitlich intensivierten Therapie (Dense-R-Up-CHOP) an.

3.3.2 Serumproben aus der RICOVER 60 Studie

In der RICOVER 60 Studie wurden Patienten mit aggressivem CD20-positivem B-Zell Lymphom im Alter von 61-80 Jahren behandelt. Die Phase-III-Studie (2x2-armige offene multizentrische prospektiv randomisierte Studie) verglich eine CHOP-Therapie mit 6 bzw. 8 Zyklen in zwei wöchigen Abständen jeweils mit oder ohne monoklonaler CD20 Antikörpertherapie Rituximab. In den insgesamt 4 Studienarmen der RICOVER 60 Studie wurde auf eine zusätzliche Bestrahlung verzichtet.

Die untersuchten Proben dieser Arbeit entstammten Patienten mit einer 6-maligen R-CHOP-14 + 2 R Therapie mit zusätzlichem G-CSF- Support (Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor) zur Verkürzung der Neutropeniedauer während der Chemotherapie um einen 14 tägigen Therapiezyklus zu realisieren.

3.3.3 Serumproben aus der UNFOLDER Studie

Die UNFOLDER Studie beschreibt eine kombinierte Immunochemotherapie mit 6 Zyklen R-CHOP bei jungen Patienten zwischen 18-60 Jahren mit aggressivem CD20-positivem B-Zell Lymphom. Verglichen wurde die Therapie mit einem Intervallabstand von 21 Tagen bzw. verkürzt auf 14 Tage.

3.4 Kühlung und Transport

Nach schriftlichem Einverständnis wurde den Patienten am jeweiligen Therapietag 30 Minuten vor Erhalt der Immunochemotherapie Blut entnommen. Im Auftrag und unter Aufsicht der DSHNHL wurden die Proben nach Trennung von Serum und Zellen auf mehrere Eppendorfgefäße aufgeteilt und in Heraeus HeraFreeze HFU 686 Basic (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bei -80 °C tiefgefroren.

3.5 Labor-Methoden

Die Arbeiten an den Serumproben fanden unter antiseptischen Bedingungen an einer Werkbank (Sicherheitswerkbank, HERAEUS Group, Hanau, Deutschland) im Forschungsgebäude des José-Carreras-Zentrums für Immun- und Gentherapie in Homburg/Saar statt. Es wurden Einwegmaterialien benutzt. Die bei -80°C im Gefrierschrank (Heraeus HeraFreeze HFU 686 Basic, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gelagerten Serumproben wurden zur weiteren Verarbeitung bei Raumtemperatur auf 18-25 °C aufgetaut, gemischt und nach Protokoll verarbeitet.

3.5.1 Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA)

Als Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) bezeichnet man ein antikörperbasiertes Verfahren zum Nachweis von Molekülen. Alle ELISA-Experimente wurden mit dem HycultBiotech Human LL-37 Kit (Hycult biotec, Uden, NL) entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden Kits mit je 96 Einzeltests mit zwei Standardreihen verwendet. Variationskoeffizient der Kits liegt bei 15%.

Die tiefgekühlten Serumproben wurden bei Raumtemperatur für ca. eine Stunde schonend aufgetaut. Die Wasch-/Pufferlösung wurde nach Angaben des Herstellers angefertigt. 60 ml (20-fache Konzentrierung) der Wasch-/Pufferlösung A wurde mit 450 ml destilliertem Wasser vermischt. 30 ml (40-fache Konzentrierung) der Wasch-/Pufferlösung B wurde mit 470 ml destilliertem Wasser vermengt. Anschließend wurden beide Lösungen gleichermaßen miteinander vermischt.

Für die Herstellung der Standardproben wurden Verdünnungsreihen angefertigt. Von dem Standard wurden nach Angaben des Analysezertifikates des HycultBiotech Human LL-37 Kit ein bestimmtes Volumen in ein Verdünnungsröhrchen pipettiert und mit 250 µl Wasch-/Pufferlösung vermischt. Dann wurden jeweils 125 µl entnommen und eine Verdünnungsreihe mit insgesamt 6 Röhrchen in absteigender Konzentration erstellt. Die Verdünnungsreihe von 100 ng/ml, 33 ng/ml, 11 ng/ml, 3,7 ng/ml, 1,2 ng/ml, 0,4 ng/ml, 0,1 ng/ml wurden mit jeweils 250 µl Wasch-/Pufferlösung aufgefüllt. Ein 7. Röhrchen erhielt keinen Standard, wurde nur mit der Wasch-/Pufferlösung gefüllt und diente als Kontroll-Gegenprobe.

Die Serumproben wurden nach Protokoll mit Wasch-/Pufferlösung um das 20-fache in einer Mikrotiterplatte (Vorverdünnungsplatte) mit 96 Wells verdünnt. 100 µl der verdünnten Proben und des angefertigten Standards wurden in die mit Antikörper (capture antibody) bemantelten Wells der ELISA-Platte gegeben, Luftblasen unter leichtem Schütteln entfernt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur abgedeckt inkubiert. Das Cathelicidin als Antigen in der Probenlösung wurde in der Inkubationszeit an die auf der ELISA-Platte fixierten Antikörper an einem Epitop gebunden. Im Anschluss wurden die ungebundenen Anteile der Proben mit der Wasch-/Pufferlösung durch 4-maliges Waschen entfernt.

Im nächsten Schritt wurden 100 µl nach Protokoll des verdünnten (1:11 Tracer: Wasch-/Pufferlösung) biotinilierten (enzymgekoppelten) Tracers (Detektionsantikörper) auf die Elisa-Platte hinzugegeben und erneut für eine Stunde abgedeckt bei Raumtemperatur inkubiert. Der Tracer (Detektionsantikörper) band an ein anderes Epitop des Antigens Cathelicidin als der Antikörper der Elisa-Platte. Es entstand ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex, der auch als Sandwich-ELISA bezeichnet wird. Der Begriff „Sandwich“ wird hier allegorisch benutzt, um das Antigen eingepackt zwischen den beiden Antikörpern zu beschreiben. Während der Inkubationszeit wurde die Streptavidin-Peroxidase-Lösung hergestellt. Vor Öffnung des Streptavidin-Peroxidase Röhrchens wurde eine Zentrifugation im Vortexer für ca. 30 Sekunden durchgeführt. 0,25 ml der hundertfach konzentrierten Streptavidin-Peroxidase-Lösung wurde mit 24,75 ml Wasch-/Pufferlösung gemischt.

Nach wiederholtem, gründlichem Waschen der ELISA-Mikrotiterplatte wurden 100 µl der vorbereiteten Streptavidin-Peroxidase-Lösung in die ELISA-Platte gegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine erneute vierfache Waschung mit der Wasch-/Pufferlösung. Anschließend wurden 100 µl Tetramethylbenzidin (TMB) Lösung in die Platte in jedes Well pipettiert. Die an die Tracer gebundene Streptavidin-Peroxidase reagierte nun mit der TMB-Lösung, wodurch das TMB oxidierte und sich von farblos in gelblich verfärbte. Die TMB-Lösung inkubierte für 30 Minuten abgedeckt mit Aluminiumfolie zum Schutz vor direktem Sonnenlicht bei Raumtemperatur.

Anschließend wurde durch Zugabe von 100 µl Stop-Lösung (Oxalsäure enthaltend) in die Wells die ablaufende Reaktion gestoppt. Das Substrat wechselte von einer blaufarbigem in eine gelbe Lösung (s. Abbildung 3). Innerhalb 30 Minuten nach Zugabe der oxalsäurehaltigen Lösung wurde die ELISA-Platte mittels Spektrometer (Plattenlesegerät Wallac, Wallac Distribution GmbH, Freiburg, Dtl.) bei einer Wellenlänge von 450 nm ausgelesen.

Durch die Absorption konnte die optische Dichte mithilfe der Standardreihe (bekannte Antigenkonzentration) und damit die Konzentration der Probenlösung um eine Kalibrierungskurve berechnet werden.

Jeder Messwert erhielt im Versuchsablauf einen Kontrollwert. Durch die Ergebnisse der Standardreihe, der Negativkontrollen sowie der Stichprobenkontrollen einzelner Proben ließ sich ein stabiler Versuchsaufbau nachweisen.

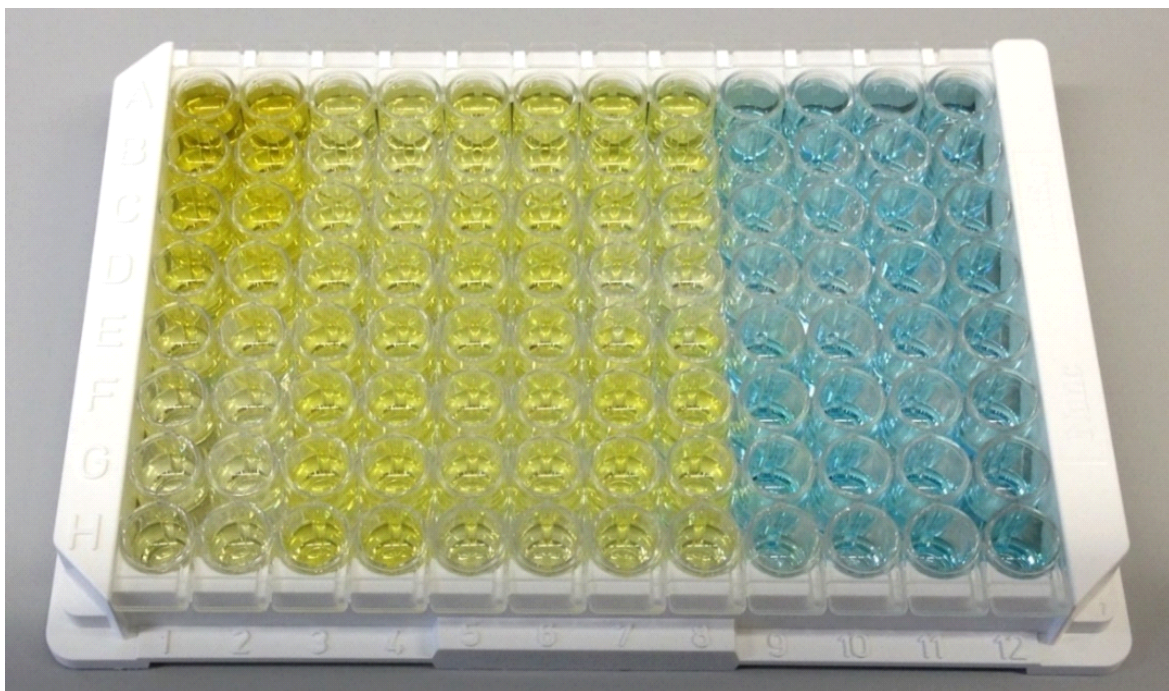


ABBILDUNG 3 BEISPIEL EINES SUBSTRATFARBUMSCHWUNGS VON BLAU NACH GELB NACH HINZUFÜGEN DER OXALHALTIGEN STOP-LÖSUNG ZUR TMB HALTIGEN PROBENLÖSUNG. DIE ERSTEN BEIDEN LINKEN REIHEN DER WELLS-PLATTE ZEIGEN DIE ANGEFERTIGTEN STANDARDREIHEN. DIESE ZEIGEN EINE DEUTLICHE FARBABNAHME NACH UNTEN (VON A ZU H).

3.5.2 Vitamin-D-Bestimmung

Die Vitamin-D-Messungen wurden mit freundlicher Unterstützung von Herrn Pape, Mitarbeiter des Zentrallabors des Universitätsklinikums des Saarlandes unter Leitung von Prof. Dr. med. Jürgen Geisel, mit dem DiaSorin® Chemolumineszenz-Assay (Saluggia, Italien) gemessen.

3.6 Statistische Methoden

Die statistische Analyse der erhobenen Daten habe ich mittels der Analysesoftware IBM SPSS Statistics Version 23 sowie mit Excel Office Version 2016 angefertigt.

Die Rohdaten wurden aus seriellen Serumproben der Patienten mittels Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (Varifikationskoeffizient 15%) ermittelt und durch Maßzahlen wie Mittelwert (M), Standardabweichung (S), Minimum (Min.), Maximum (Max.), Medianwert (X') und der Quartildistanz (IQR, Quartile bei Q1/Q3) beschrieben.

Nach der Analyse der Ergebnisse jedes Therapietages sowie der Therapiegruppen wurden der Verlauf der Cathelicidinkonzentrationen sowie das Cathelicidin Tages- und Therapiemaximum/-minimum berechnet (Tabelle 7). Die graphische Darstellung der Cathelicidinkonzentrationen an den jeweiligen Therapietagen beider Therapiegruppen erfolgte mittels Boxplots zur Darstellung der medianen Konzentrationen, der Quartilabstände sowie der Extremwerte.

Die Verteilung der Messwerte wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test geprüft. Dieser wies keine statistisch signifikanten Abweichungen zum Modell einer Normalverteilung auf, so dass eine Normalverteilung der Daten grundsätzlich angenommen werden konnte. Daher erfolgte der Vergleich der beiden untersuchten Gruppen (Dense-R-CHOP und Standard-R-CHOP Therapie) an den Therapietagen mittels eines parametrischen Verfahrens, dem t-test für unverbundene Stichproben. Ob eine statistisch signifikante Steigerung der Cathelicidinkonzentration nachzuweisen ist, wurde mit dem t-Test für verbundene Stichproben für das entsprechende Therapieintervall berechnet. Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde für P-Werte $p \leq 0,05$ angenommen.

Zur Veranschaulichung und zum Vergleich der einzelnen Vitamin-D-Konzentrationen wurde ein Balkendiagramm erstellt. Die Stärke des Zusammenhangs der Cathelicidinkonzentration an Tag 1, dem Verlauf der Cathelicidinkonzentration während der Therapie und Vitamin-D wurde nach Prüfung normalverteilter Daten mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test mittels des Pearson-Korrelationskoeffizienten bewertet (Tabelle 8). Für den Pearson-Korrelationskoeffizienten gilt $0,3 < |r| < 0,7$ für einen schwachen bis mäßigen Zusammenhang, $|r| > 0,7$ für einen starken Zusammenhang der Variablen.

4 Ergebnisse

Insgesamt wurden 60 Serumproben an den Tagen 1, 15, 29 und 42 während einer Immunochemotherapie nach R-CHOP Schema untersucht. Die Patientenproben wurden zur graphischen Darstellung und für weitere deskriptive Statistik in zwei Gruppen unterteilt. Eine Gruppe erhielt eine intensivierte Therapie (Dense-R-CHOP) mit Rituximabgaben an Therapietag 1, 4, 8, 15, 22, 29 und 43. Die andere Gruppe bestand aus Patienten mit Standard-Therapieschema mit Rituximabgabe an den Tagen 1, 15, 29 und 43.

32 Serumproben stammten von Patienten mit einer intensivierten Immunochemotherapie (Dense-R-Up) und 28 Proben von Patienten aus der Standard-R-CHOP-14 Therapie. In Serumproben, entnommen an Tag 1 der Therapie jeweils vor Therapiegabe, wurde zusätzlich die Vitamin-D-Konzentration gemessen.

Für weitere statistische Berechnungen wurde der Mittelwert aus dem Mess- und dem Kontrollwert berechnet, soweit der Kontrollwert nicht über 15% des ersten Messwertes abwich. Bei einer Abweichung der Messwerte $\geq 15\%$ wurde die Probenmessung in dieser Arbeit nicht weiterverwendet. Zusätzlich wurden für ein korrektes Versuchsvorgehen bei jeder Messung von Serumproben zwei Kontrollreihen in absteigender Konzentration sowie eine Negativkontrolle angefertigt. Stichprobenartig wurden einzelne Serumproben zweimal gemessen, um unterschiedliche Konzentrationsergebnisse durch Einsatz verschiedener Cathelicidin-Kit Chargen zu ermitteln. Unterschiedliche Konzentrationen mit einer Abweichung von $> 10\%$ wurden als Grenzwert gesetzt. Solche Abweichungen konnten jedoch bei keiner Stichprobenkontrolle festgestellt werden.

Die erhobenen Daten wurden den jeweiligen Therapietagen zugeordnet und durch verschiedene Maßzahlen beschrieben (Tabellen 3-6). Der Verlauf der Cathelicidinkonzentration während der Therapie wurde graphisch in den Abbildungen 8 und 9 dargestellt.

Weiterhin wurde bei jedem Patienten der Verlauf der Cathelicidinkonzentration von Therapietag 1 zu Therapietag 15, Therapietag 15 zu Therapietag 29 sowie Therapietag 29 zu Therapietag 43 berechnet (Tabelle 7). Aus diesen Konzentrationsverläufen wurde ein Mittelwert ermittelt. Dieser Wert wurde auf eine Korrelation mit der gemessenen Vitamin-D-Konzentration überprüft (Tabelle 7 und 8 und Abbildung 8-12).

Im Folgenden finden sich Tabellen und Abbildungen, die die Ergebnisse bildlich veranschaulichen.

4.1 Patientencharakteristika

Die Tabelle 2 zeigt Patientenseren aus verschiedenen Studien der DSNHL. Insgesamt entstammten 8 der untersuchten Proben von weiblichen, 7 der Proben von männlichen Studienteilnehmern. Von den 8 Patienten der intensivierten Immunotherapie (ID 3-20) waren 3 Patienten weiblich, von den 7 Patienten der Standard-R-CHOP (ID 139-1402) Therapie waren 4 Patienten weiblich. Im Durchschnitt waren die Patienten 63,2 Jahre bei der ersten Probenentnahme.

12 der 15 Patienten erreichten eine komplette Remission. Zwei Patienten zeigten ein Rezidiv im Studienverlauf. Ein Rezidiv bekam die Patientin mit der ID 18 fünf Jahre nach Therapiebeginn mit 6x CHOP-14/ 12x Rituximab. Ein weiteres Rezidiv bekam die Patientin mit der ID 169 2011, 3 Jahre nach Therapiebeginn mit 6x R-CHOP-21.

Eine Patientin (ID 11) verstarb 2008 4 Jahre nach dem ersten Therapiezyklus an septischen Multiorganversagen. Alle Patienten der in dieser untersuchten Arbeit erkrankten an einem großzelligen B-Zell NHL. 12 Patienten erkrankten an einem diffus großzelligen B Zell Lymphom. Bei einem Patienten konnte sowohl ein diffus als auch ein follikuläres B-Zell Lymphom, bei einem ein follikuläres IIIa und bei einem Patienten ein follikuläres IIb B-Zell Lymphom nachgewiesen werden.

Tabelle 3 Studiendaten der untersuchten Serumproben

ID #	Initia- len	Ge- burts- jahr	S- e- x	Studie	Thera- pie	Pro- ben- ent- nah- me Jahr	CR/ Jahr	Rezi- div Jahr	Sterbezeit- punkt/ Ursache	Histologie
3	ER	1942	W	CHOP- R-ESC	6x CHOP- 14/12x	2004	2010	n.b.	n.b.	B-Zell Reihe: centroblastisch diffus großzellig
4	EN	1939	W	CHOP- R-ESC	6x CHOP- 14/12x	2004	2010	n.b.	n.b.	B-Zell Reihe: centroblastisch diffus großzellig
5	PD	1935	M	CHOP- R-ESC	6x CHOP- 14/12x	2004	2006	n.b.	n.b.	B-Zell Reihe: diffus großzellig
10	KS	1936	M	CHOP- R-ESC	6x CHOP- 14/12x	2004	2010	n.b.	n.b.	B-Zell Reihe: diffus großzellig
11	HH	1942	W	CHOP- R-ESC	6x CHOP- 14/12x	2004	2008	n.b.	2008 Septisches Multiorgan- versagen	B-Zell Reihe: centroblastisch diffus großzellig
14	WS	1926	M	CHOP- R-ESC	6x CHOP- 14/12x	2005	2010	n.b.	n.b.	B-Zell Reihe: diffus großzellig
18	GC	1928	W	CHOP- R-ESC	6x CHOP- 14/12x	2005	2009	2010	n.b.	B-Zell Reihe: centroblastisch diffus großzellig
20	DS	1929	W	CHOP- R-ESC	6x CHOP- 14/12x	2005	2010	n.b.	n.b.	B-Zell Reihe: diffus großzellig
140 0	RK	1936	w	Ricove r-60	6x CHOP- 14+G-	2005	2010	n.b.	n.b.	B-Zell Reihe: diffus großzellig

					CSF/ 8xR					
140 1	KE	1935	m	Ricove r-60	6x CHOP- 14+G- CSF/ 8xR	2006	2010	n.b.	n.b.	Follikulär III und diffuses B-Zell Lymphom
140 2	RT	1943	m	Ricove r-60	6x CHOP- 14+G- CSF/ 8xR	2006	2008	n.b.	n.b.	B-Zell Reihe: follikulär IIIa Proliferationsrat e: 20-40%
139	GB	1963	m	UNFOL DER 21/14	6x R- CHOP- 21 mit RX	2007	2013	n.b.	n.b.	B-Zell Reihe: diffus großzellig
140	KB	1963	w	UNFOL DER 21/14	6x R- CHOP- 21 ohne RX	2007	2013	n.b.	n.b.	B-Zell Reihe: centroblastisch diffus großzellig
169	SM	1958	w	UNFOL DER 21/14	6x R- CHOP- 21 ohne RX	2008	2009	2011 Progre ssion 2011	n.b.	B-Zell Reihe: follikulär IIIb
193	RS	1965	m	UNFOL DER 21/14	6x R- CHOP- 21 mit RX	2008	2013	n.b.	n.b.	B-Zell Reihe: unklassifiziert (technisch unzureichend) Wahrscheinlich. : B-Zell- Lymphom diffus großzellig

Abkürzung: ID: Identifikation; Sex w: weiblich, m: männlich; CR: complete response, komplette Remission, RX: Bestrahlung, n.b.: nicht bekannt, Zeitpunkt ggf. außerhalb des Studienkontrollzeitraumes

4.2 Vergleich der Cathelicidinkonzentrationen in der Dense-R-CHOP und in der Standard-R-CHOP Population an Tag 1 der Therapie

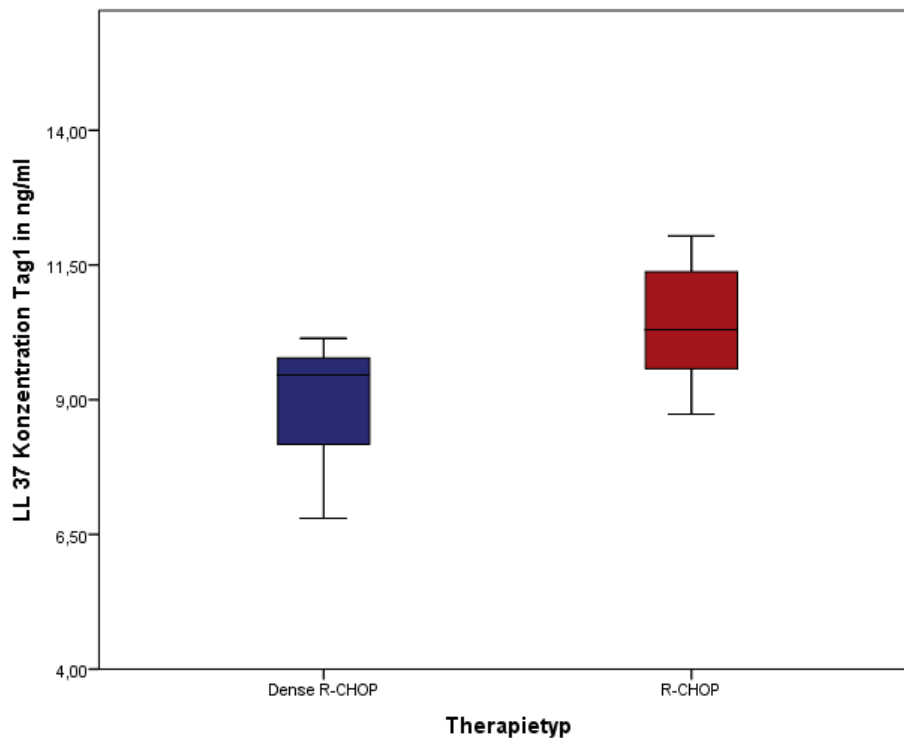


ABBILDUNG 4 STUDIENDATEN DER UNTERSUCHTEN SERUMPROBEN

TABELLE 4 STATISTISCHE AUSWERTUNG ZU CATHELICIDINMESSUNGEN DER SERUMPROBEN AN TAG 1

Therapie-Typ R-CHOP Tag 1	Cathelicidin- Mittelwert in ng/ml	Median ng/ml	Min. in ng/ml	Max. in ng/ml	IQR	p-Wert für Mittelwerte
Standard	10,42	10,30	8,73	12,04	9,28 – 11,66	0,034
Dense	8,97	9,46	6,80	10,14	8,10 – 9,89	

IQR: Interquartilsabstand

Um die Cathelicidinkonzentrationen an Tag 1 der Therapie weiter zu beschreiben, wurde eine deskriptive Statistik angelegt. Der Mittelwert der Cathelicidinkonzentration betrug in der intensivierten Therapiegruppe 8,87 ng/ml. Die Standard-R-CHOP-Therapiegruppe zeigte einen höheren Cathelicidinmittelwert von 10,42 ng/ml. Die höchste Cathelicidinkonzentration an Tag 1 beider Immunochemotherapien war in der Standard-R-CHOP-Therapiegruppe zu messen. Die Mittelwerte der Cathelicidinkonzentration beider Therapien verglichen, ergaben einen signifikanten Unterschied von 1,46 ng/ml ($p = 0,034$).

4.3 Vergleich der Cathelicidinkonzentrationen in der Dense-R-CHOP und in der Standard-R-CHOP Population an Tag 15 der Therapie

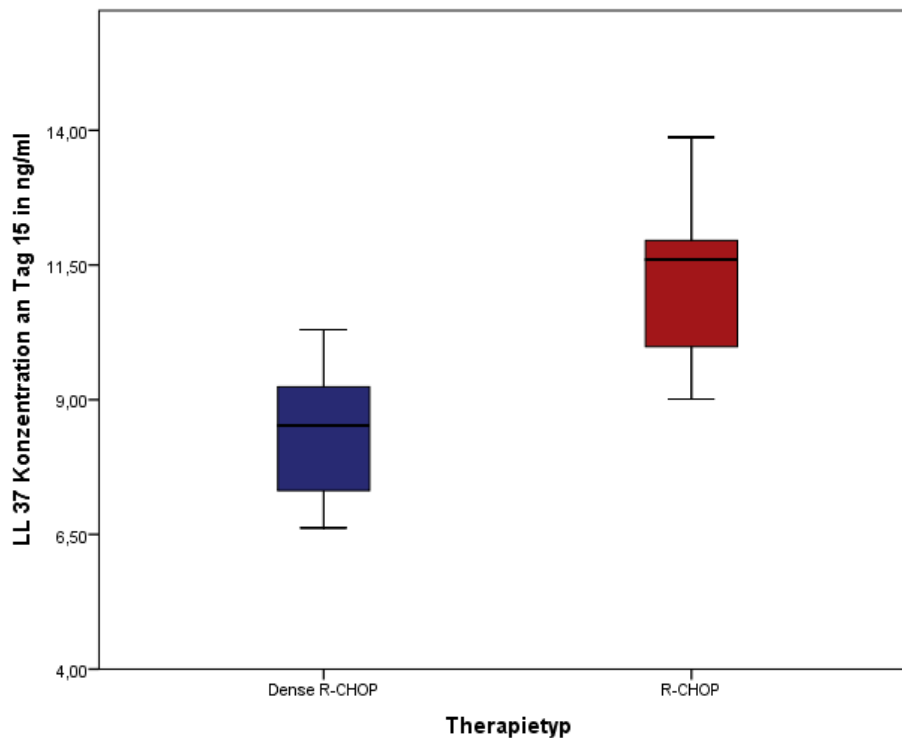


ABBILDUNG 5 SERUMKONZENTRATIONEN VON CATHELICIDIN IN NG/ML AN TAG 15 DER THERAPIE AUFGETEILT IN THERAPIETYPEN

TABELLE 5 STATISTISCHE AUSWERTUNG ZU CATHELICIDINMESSUNGEN DER SERUMPROBEN AN TAG 15

Therapie-Typ R-CHOP Tag 15	Cathelicidin- Mittelwert in ng/ml	Median ng/ml	Min. in ng/ml	Max. in ng/ml	IQR	p-Wert für Mittelwerte	P-Wert für Steigerung Tag 1 - 15
Standard	11,19	11,60	9,01	13,87	9,29 – 12,13	0,003	0,244
Dense	8,38	8,52	6,62	10,30	7,26 – 9,54		

Der Mittelwert der Cathelicidinkonzentration in der Gruppe nach Standard-R-CHOP Therapieschema betrug 11,19 ng/ml, in der Gruppe nach Dense-R-CHOP Therapieschema 8,38 ng/ml. Ein Vergleich der Mittelwerte zeigt eine höhere Cathelicidinkonzentration in der Standard-Therapiegruppe. Wie bereits schon an Tag 1 der Therapie ist die höchste Cathelicidinkonzentration in der Standard-Therapiegruppe, die kleinste Konzentration in der Dense-R-CHOP-Therapiegruppe nachzuweisen.

Der Vergleich der Mittelwerte der Cathelicidinkonzentrationen beider Therapien, ergab einen signifikanten Unterschied von 2,81 ng/ml ($p = 0,003$). Eine signifikante Steigerung der Cathelicidinkonzentration von Tag 1 auf Tag 15 ließ sich nicht nachweisen ($p = 0,244$).

4.4 Vergleich der Cathelicidinkonzentrationen in der Dense-R-CHOP und in der Standard-R-CHOP Population an Tag 29 der Therapie

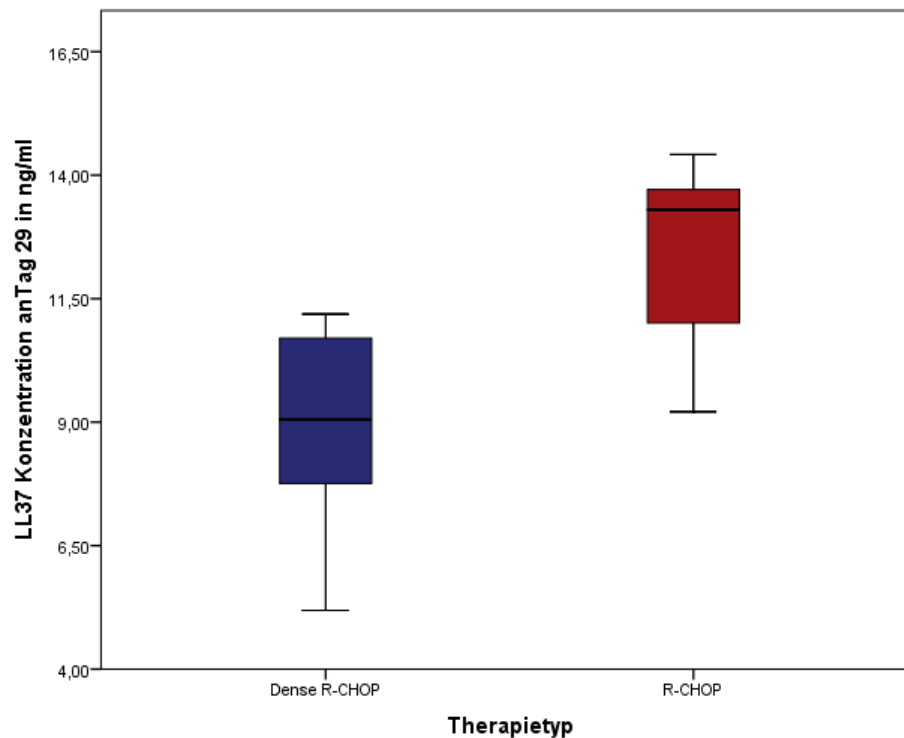


ABBILDUNG 6 SERUMKONZENTRATIONEN VON CATHELICIDIN IN NG/ML AN TAG 29 DER THERAPIE AUFGETEILT IN THERAPIETYPEN

TABELLE 6 STATISTISCHE AUSWERTUNG ZU CATHELICIDINMESSUNGEN DER SERUMPROBEN AN TAG 29

Therapie-Typ R-CHOP Tag 29	Cathelicidin- Mittelwert in ng/ml	Median ng/ml	Min. in ng/ml	Max. in ng/ml	IQR	p-Wert für Mittelwerte	P-Wert für Steigerung Tag 15 - 29
Standard	12,34	13,30	9,21	14,42	10,93 – 13,86	0,006	0,348
Dense	8,93	9,06	5,19	11,19	7,60 – 10,73		

Der Mittelwert der Cathelicidinkonzentration in der Gruppe des Standard-R-CHOP Therapieschematas betrug 12,33 ng/ml, in der Gruppe mit dem Dense-R-CHOP Therapieschematas 8,93 ng/ml. Auch an Tag 29 zeigte die Standard-Therapiegruppe höhere Cathelicidinkonzentrationen. Auch die höchste Cathelicidinkonzentration des Therapietages konnte in der Standard-Therapiegruppe gemessen werden. Die höchste Cathelicidinkonzentration mit 14,42 ng/ml der in dieser Arbeit untersuchten Proben zeigte sich an Tag 29 in der Standard-Therapiegruppe. Zusätzlich zeigt sich an diesem Therapietag die größte Differenz der Mittelwerte beider Therapiegruppen (Δ 3,40).

Der Vergleich der Cathelicidinkonzentrationen beider Therapien ergab einen signifikanten Unterschied von 3,41 ng/ml ($p=0,006$). Eine signifikante Steigerung der Cathelicidinkonzentration von Tag 15 auf Tag 29 ließ sich nicht nachweisen ($p=0,348$).

4.5 Vergleich der Cathelicidinkonzentrationen in der Dense-R-CHOP und in der Standard-R-CHOP Population an Tag 43 der Therapie

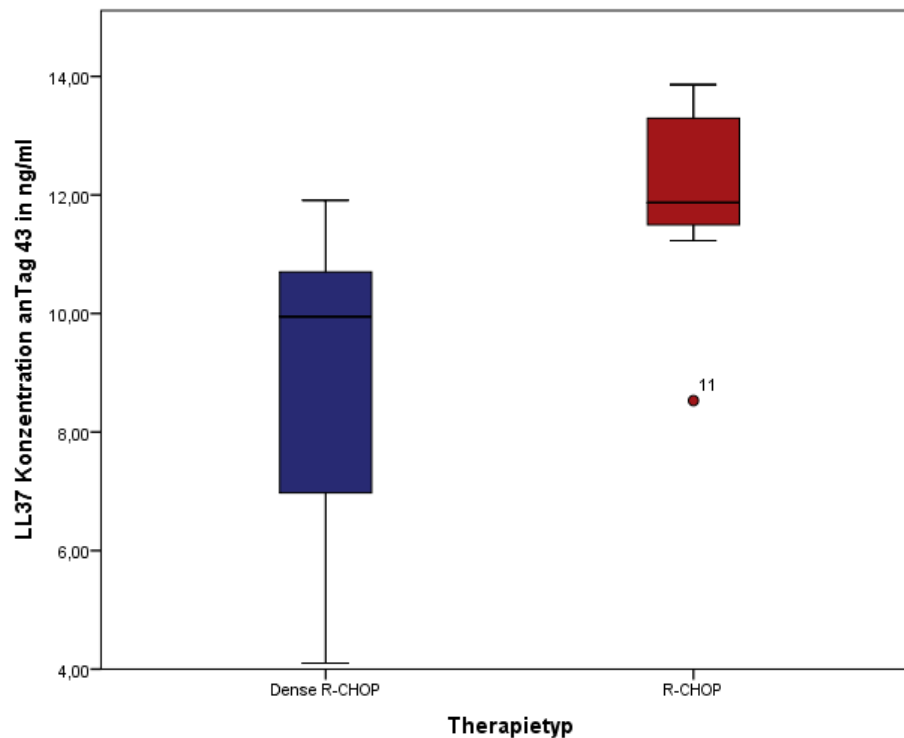


ABBILDUNG 7 SERUMKONZENTRATIONEN VON CATHELICIDIN IN NG/ML AN TAG 43 DER THERAPIE AUFGETEILT IN THERAPIETYPEN

TABELLE 7 STATISTISCHE AUSWERTUNG ZU CATHELICIDIN-MESSUNGEN DER SERUMPROBEN AN TAG 43

Therapie- Typ R-CHOP Tag 43	Cathelicidin- Mittelwert	Median ng/ml	Min.	Max.	IQR	p-Wert für Mittelwerte	P-Wert für Steigerung Tag 29 - 43
Standard	11,98	11,87	8,53	11,98	11,23 – 13,30	0,025	0,977
Dense	8,91	9,95	4,10	11,91	6,34 – 10,71		

Der Mittelwert der Cathelicidinkonzentration in der Gruppe des Standard-R-CHOP Therapieschema betrug 11,98 ng/ml, in der Gruppe des Dense-R-CHOP Therapieschema 8,90 ng/ml. Wie bereits an den vorherigen Therapietagen zeigte die Standard-Therapiegruppe an Tag 43 einen höheren Mittelwert der Cathelicidinkonzentration als die Dense-R-CHOP Therapiegruppe. Zusätzlich konnte an Tag 43 die höchste Cathelicidinkonzentration des Therapietages in der Standard-Therapiegruppe gemessen werden. Die kleinste Cathelicidinkonzentration aller Therapietage konnte am Tag 43 mit 4,20 ng/ml in der Dense-R-CHOP Therapiegruppe gemessen werden.

Der Vergleich der Cathelicidinkonzentrationen beider Therapien verglichen, ergab einen signifikanten Unterschied von 3,07 ng/ml ($p=0,025$). Eine signifikante Steigerung der Cathelicidinkonzentration von Tag 29 auf Tag 42 ließ sich nicht nachweisen ($p=0,977$).

In allen Therapietagen zeigt die Standard-Therapiegruppe höhere Cathelicidinkonzentrationen.

Im Durchschnitt waren die Mittelwerte der Cathelicidinkonzentrationen in der Standard-Therapiegruppe um 2,69 ng/ml (Streuung: 1,45 ng/ml – 3,40 ng/ml) größer als in der Dense-R-CHOP Therapiegruppe. Die höchsten Cathelicidinkonzentrationen konnten an allen Therapietagen in der Standard-Therapiegruppe gemessen werden. Die Cathelicidinkonzentrationen der Standard-Therapiegruppe waren im Durchschnitt 2,215 ng/ml (Streuung: 0,07 ng/ml – 3,57 ng/ml) höher als die Cathelicidinkonzentrationen der Dense-R-CHOP Therapiegruppe. Das Cathelicidinminimum war in der Standard-Therapiegruppe im Durchschnitt um 3,19 ng/ml (Streuung: 1,93 ng/ml- 4,43 ng/ml) geringer als in der Dense-R-CHOP Therapiegruppe.

4.6 Graphische Darstellung der Cathelicidinkonzentrationen der Dense-R-CHOP Therapiegruppe im Therapieverlauf

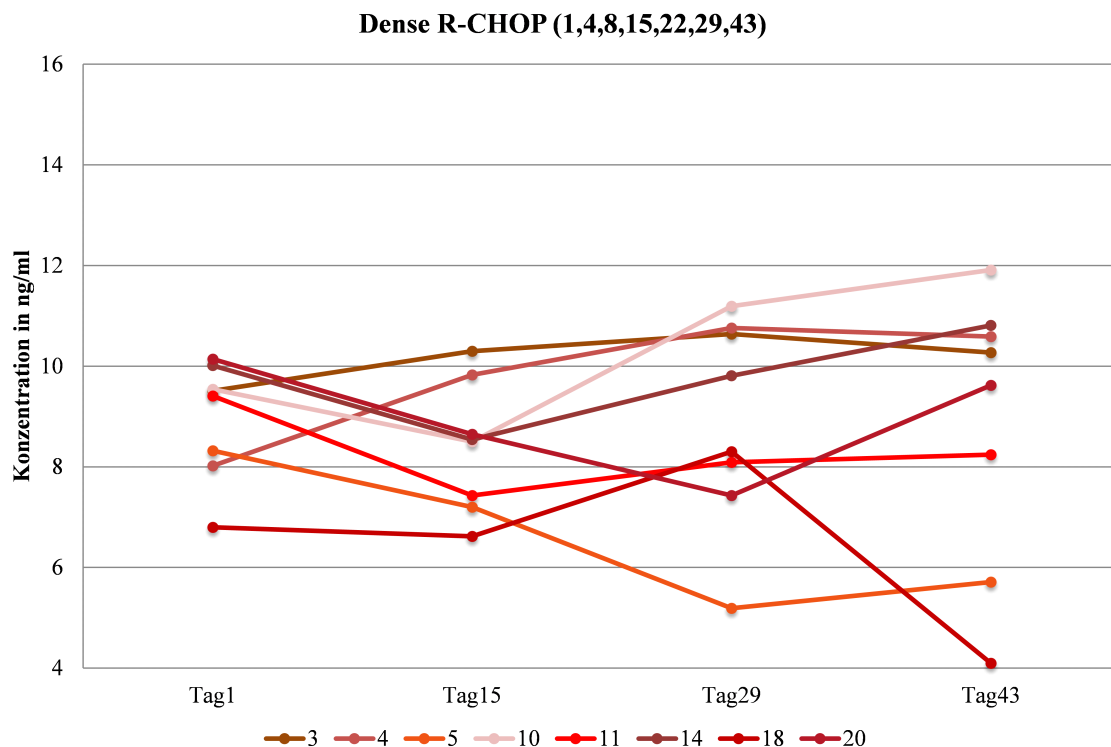


ABBILDUNG 8 GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER CATHELICIDINKONZENTRATIONEN IN NG/ML IM ZEITLICHEN THERAPIEVERLAUF DER PATIENTEN MIT BEHANDLUNG NACH DEM DENSE-R-CHOP (1,4,8,15,22,29,43) SCHEMA

Um die Cathelicidinkonzentrationen der Patienten der intensivierten Immunochemotherapie (Dense-R-CHOP-Therapiegruppe) im Therapieverlauf darzustellen, wurde ein Liniendiagramm (Abbildung 10) erstellt. Insgesamt wurden 3 Therapiezeiträume beschrieben. Der erste Zeitraum beschreibt die Konzentrationsentwicklung von Tag 1 zu Tag 15, der zweite Zeitraum von Tag 15 bis 29 und der dritte Zeitraum beschreibt den Konzentrationsverlauf von Tag 29 zu Tag 43 der Therapie. Die Cathelicidinkonzentration in den 3 Therapiezeiträumen zeigten starke Variationen zwischen Start- und Endpunkt als auch in den Cathelicidin-Konzentrationsverläufen während der Therapie.

Einheitliche Verläufe, wie etwa eine kontinuierliche Steigerung der Cathelicidinkonzentration, waren nicht zu beobachten. Bei einigen Patienten konnte das Maximum der Cathelicidinkonzentration an Tag 1 der Therapie (Patient ID# 5), bei anderen an Tag 15 (ID 18) oder an Tag 43 (ID 10) der Therapie gemessen werden. Auch die geringsten Cathelicidinkonzentrationen der jeweiligen Patienten wurden an unterschiedlichen Therapietagen gemessen.

4.7 Graphische Darstellung der Cathelicidinkonzentrationen der Standard-R-CHOP Therapiegruppe im Therapieverlauf

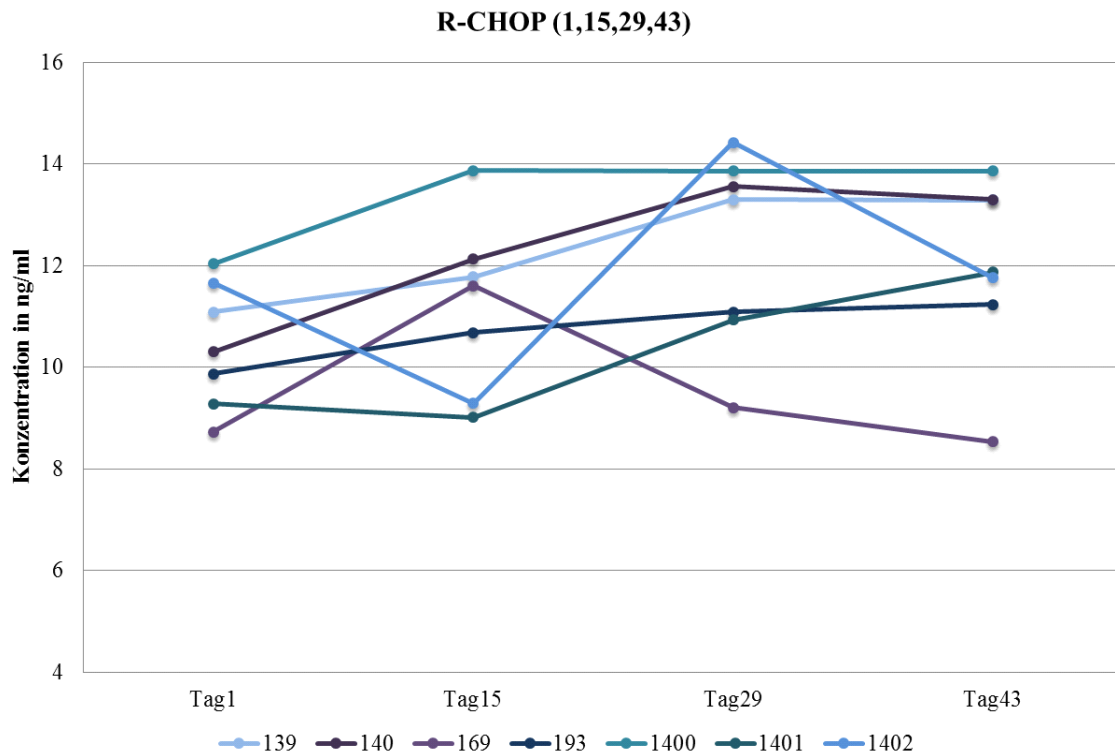


ABBILDUNG 9 GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER CATHELICIDINKONZENTRATIONEN IN NG/ML IM ZEITLICHEN THERAPIEVERLAUF DER PATIENTEN MIT BEHANDLUNG NACH DEM REGULÄREN R-CHOP (1,15,29,43) SCHEMA

Die Abbildung 9 stellt die Cathelicidinkonzentrationen (LL37) der Patientengruppe der Standard-Immunochemotherapie nach R-CHOP Schema im Therapieverlauf dar. Auch in dieser Abbildung wird deutlich, dass keine einheitlichen Cathelicidin-Konzentrationsverläufe gemessen werden konnten. Anfangs- und Endkonzentrationen variierten. Das Minimum als auch das Maximum der Cathelicidinkonzentrationen wurde an unterschiedlichen Therapietagen gemessen.

Bei einigen Patienten kam es zu einer Zunahme der Cathelicidinkonzentration mit einem Maximum der Cathelicidinkonzentration an Tag 43 der Therapie (ID 193). In anderen Serumproben ließen sich jedoch an Tag 43 die geringsten Cathelicidinkonzentrationen im Therapieverlauf messen (ID 169). Auch der Verlauf der Cathelicidinkonzentration gemessen an Therapietag 15 und 29 variierte. Bei einigen Patienten zeigte sich eine anfängliche Steigerung von Tag 1 zu Tag 15 der Therapie, jedoch im Verlauf eine Reduktion der Cathelicidinkonzentration. Andere Cathelicidinkonzentrationen zeigten sich im Verlauf kontinuierlich abfallend zwischen den Tagen 1 und 29 und mit einem starken Anstieg zwischen Tag 29 und 43 der Therapie (1401 und 1402).

4.8 Cathelicidinkonzentrationen im Therapieverlauf

TABELLE 8 WERTE DER CATHELICIDINKONZENTRATIONEN IN NG/ML WÄHREND DER THERAPIE, ENTWICKLUNG DER CATHELICIDINKONZENTRATIONEN IN % IM THERAPIEVERLAUF

ID		Mittelwerte				Entwicklung			
Therapietyp	Patient #	Tag 1	Tag 15	Tag 29	Tag 43	Entwicklung 1 - 15	Entwicklung 15 - 29	Entwicklung 29 - 43	Durschn. Wachstum
Dense R-CHOP	3	9.51	10.3	10.64	10.27	8.3%	3.3%	-3.5%	8.0%
	4	8.02	9.83	10.76	10.59	22.6%	9.5%	-1.6%	32.0%
	5	8.32	7.2	5.19	5.71	-13.5%	-27.9%	10.0%	-31.4%
	10	9.54	8.5	11.19	11.91	-10.9%	31.6%	6.4%	24.8%
	11	9.41	7.43	8.09	8.24	-21.0%	8.9%	1.9%	-12.4%
	14	10.01	8.54	9.81	10.81	-14.7%	14.9%	10.2%	8.0%
	18	6.8	6.62	8.3	4.1	-2.6%	25.4%	-50.6%	-39.7%
	20	10.14	8.65	7.43	9.62	-14.7%	-14.1%	29.5%	-5.1%
R-CHOP	139	11.09	11.78	13.3	13.29	6.2%	12.9%	-0.1%	19.8%
	140	10.3	12.13	13.56	13.3	17.8%	11.8%	-1.9%	29.1%
	169	8.73	11.6	9.21	8.53	32.9%	-20.6%	-7.4%	-2.3%
	193	9.87	10.68	11.09	11.23	8.2%	3.8%	1.3%	13.8%
	1400	12.04	13.87	13.86	13.86	15.2%	-0.1%	0.0%	15.1%
	1401	9.28	9.01	10.93	11.87	-2.9%	21.3%	8.6%	27.9%
	1402	11.66	9.29	14.42	11.76	-20.3%	55.2%	-18.4%	0.9%

Die Tabelle 7 zeigt die genauen Werte sowie die durchschnittliche Entwicklung der Cathelicidinkonzentration der Patienten während der Therapie.

Die Konzentrationsentwicklung von Therapietag 1 zu Therapietag 15 streute in der Standard-R-CHOP Therapiegruppe (ID: 139-1402) zwischen -20,3% (min.) bis +32,9% (max.), in der Standard-R-CHOP Therapiegruppe (ID: 3-20) zwischen -21,0% (min.) bis +22,6% (max.).

Während des Therapiezeitraums Tag 15 zu Tag 29 variierten die Cathelicidinkonzentrationen in der Standard-R-CHOP Therapiegruppe zwischen -20,6% (min.) und +55,2% (max.), in der intensivierten Therapiegruppe zwischen -27,9% (min.) und 31,6% (max.).

Der dritte Therapiezeitraum zwischen den Therapietagen 29 und 43 zeigte in der Standard-R-CHOP Therapiegruppe eine Entwicklung von -18,4 (min.) bis +8,6% (max.) sowie in der intensivierten Therapiegruppe Werte zwischen -50,6% (min.) und +29,5 % (max.).

Insgesamt zeigten sich unterschiedliche Konzentrationsverläufe, die stark um einen Mittelwert (2,01 ng/ml) streuten. Das durchschnittliche Wachstum in der intensivierten Therapiegruppe (Dense-R-CHOP) variierte zwischen -2,3% (min.) und +29,1% (max.). In der Standard-Therapiegruppe waren durchschnittliche Konzentrationsverläufe zwischen -39,7% (min.) und +32,0% (max.) zu messen.

4.9 Vitamin-D-Konzentrationen an Tag 1 der Therapie

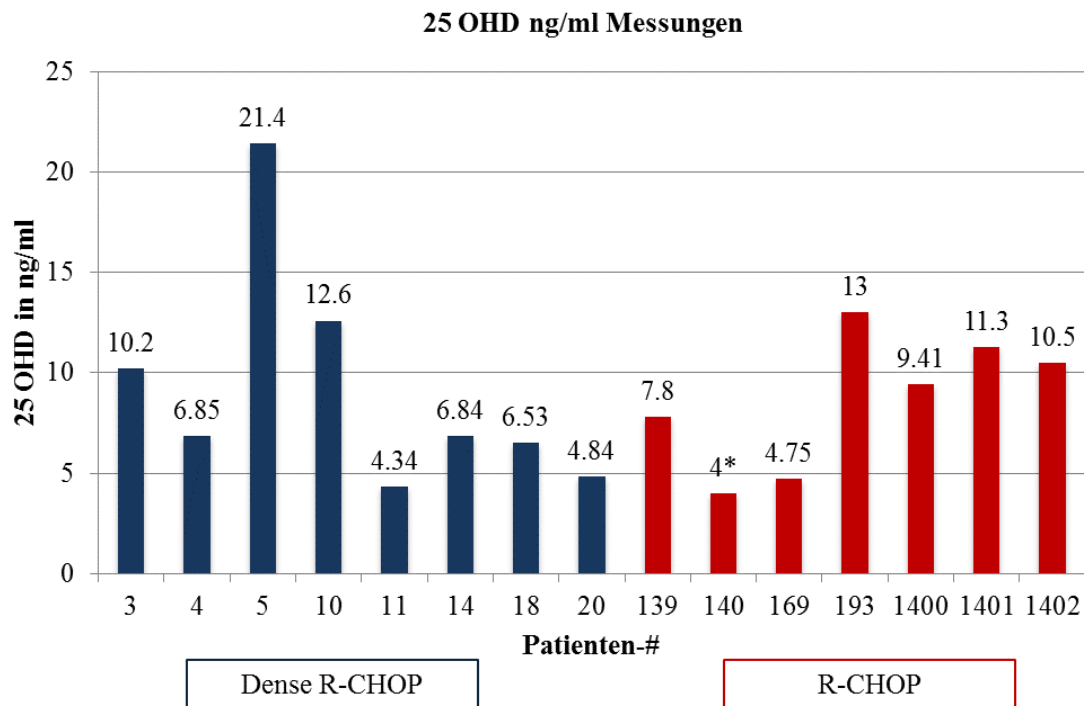


ABBILDUNG 10 GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER VITAMIN-D-KONZENTRATION IN NG/ML AN TAG 1 DER THERAPIE BEIDER PATIENTENGRUPPEN (R-CHOP UND DENSE-R-CHOP). *GEMESSENE VITAMIN- D-KONZENTRATION \leq 4NG/ML

Das Balkendiagramm zeigt die Vitamin-D-Konzentrationen (OHD 25) in ng/ml der Patienten (#ID) an Tag 1, 30 Minuten vor Therapiebeginn. Die Vitamin-D-Konzentration des Patienten ID# 140 konnte, aufgrund einer Vitamin-D-Konzentration von unter 4 ng/ml nicht exakt gemessen werden. Die Konzentration wurde in der Abbildung 10 mit 4 ng/ml* angegeben.

Alle untersuchten Serumproben zeigten Konzentrationen unterhalb der Normwertgrenze von 30 ng/ml. Ein Vitamin-D-Mangel konnte in 9 Proben (60%) nachgewiesen werden.

Die durchschnittliche Vitamin-D-Konzentration der messbaren Proben lag bei 8,95 ng/ml und liegt damit im Bereich eines Vitamin-D-Mangels.

4.10 Zusammenhang der Cathelicidinkonzentrationen im Therapieverlauf, der Cathelicidinkonzentration an Tag 1 und der Vitamin-D-Konzentration

TABELLE 9 KORRELATION ZWISCHEN CATHELICIDINKONZENTRATIONEN, VERLAUF DER CATHELICIDINKONZENTRATIONEN SOWIE GEMESSENER VITAMIN-D-KONZENTRATION

Korrelationskoeffizient zwischen durchschnittlicher LL37 Entwicklung und LL37-Mittelwert der Patienten an Tag 1	0,444
Korrelationskoeffizient zwischen durchschnittlicher LL37 Entwicklung und OHD beider Therapiegruppen	-0,168
Korrelationskoeffizient zwischen durchschnittlicher LL37 Entwicklung und OHD der DENSE-R-CHOP Therapie	-0,004
Korrelationskoeffizient zwischen durchschnittlicher LL37 Entwicklung und OHD Standard-R-CHOP Therapie	-0,196

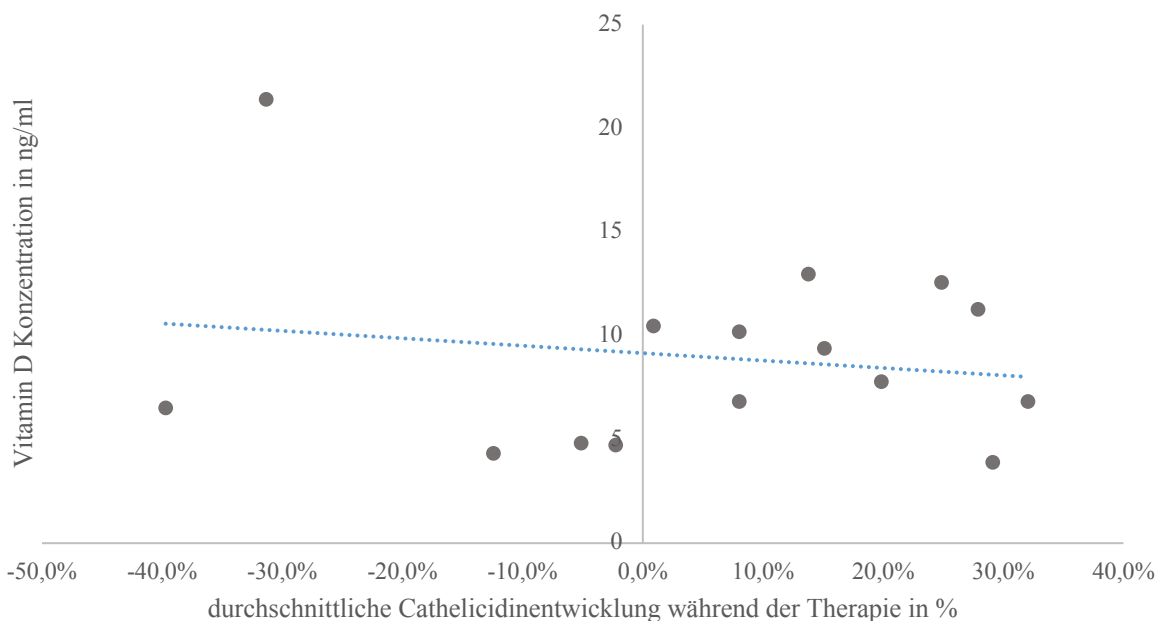


ABBILDUNG 11 KORRELATION DER DURCHSCHNITTlichen CATHELICIDINKONZENTRATIONEN IM THERAPIEVERLAUF UND DER PATIENTENZUGEHÖRIGEN VITAMIN-D-KONZENTRATION IN NG/ML AN TAG 1 DER THERAPIE

Um einen linearen Zusammenhang zwischen der durchschnittlichen Entwicklung der Cathelicidinkonzentration und der Cathelicidinkonzentration an Tag 1 der Therapie beider Therapiegruppen zu überprüfen, wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson verwendet. Der Wert betrug 0,444 und wies damit auf einen mäßigen linearen Zusammenhang hin. Somit war die Entwicklung der Cathelicidinkonzentration im Therapieverlauf nur geringfügig von der Cathelicidinkonzentration an Tag 1 der Therapie abhängig (Abbildung 11).

Der Korrelationskoeffizient nach Pearson zwischen dem durchschnittlichen Konzentrationsverlauf von Cathelicidin und der Vitamin-D-Konzentration an Tag 1 der Therapie beider Therapiegruppen ergab einen negativen Wert im Bereich von 0 und zeigte damit keine Korrelation beider Variablen.

Weiterhin wurde mittels des Pearson-Korrelationskoeffizienten überprüft, ob eine Korrelation zwischen dem Verlauf der Cathelicidinkonzentrationen während der Therapie und der Vitamin-D-Konzentration bestand. In der intensivierten Therapiegruppe (Dense-R-CHOP Therapiegruppe) zeigte sich ein Korrelationskoeffizient von 0. Der Wert in der Standard-Therapiegruppe betrug -0,196.

Die berechneten Korrelationskoeffizienten ergaben, dass kein linearer Zusammenhang zwischen beiden Variablen in den Therapiegruppen bestand. Die Abbildung 11 veranschaulicht, dass kein linearer Zusammenhang zwischen der durchschnittlichen Cathelicidinentwicklung und der Vitamin-D-Konzentration gegeben war.

5 Diskussion

5.1 Cathelicidinkonzentrationen im Therapieverlauf

Mehrere Studien haben einen Zusammenhang zwischen Lymphomtherapie, der durch sie ausgelösten ADCC und Cathelicidin beschrieben^{87,96,97}. Allerdings sind die molekularen Mechanismen, die diesen Prozess bestimmen, noch nicht vollständig verstanden⁸⁷. In der vorliegenden Arbeit habe ich die Konzentration von Cathelicidin in Serumproben gemessen und eine mögliche Rolle von Cathelicidin als Marker der ADCC von NK-Zellen in der Immunchemotherapie der diffus-großzelligen B-Zell-Lymphome untersucht.

Müller et al. untersuchten die Pharmakokinetik von Rituximab in einer Phase-II-Studie. Die mediane Rituximabdosis lag bei 671 mg, die Halbwertszeit von Rituximab - abhängig von Gewicht und Geschlecht des Patienten - im Durchschnitt bei 27 Tagen. Während der Therapie konnte eine kontinuierliche Steigerung mit Maximum der Rituximabkonzentration am letzten Therapiezyklustag gemessen werden (Steigerung von 38,9 µg/ml nach der ersten auf 140 µg/ml nach der letzten Rituximabinfusion)⁹⁸.

Weder die Standard-R-CHOP noch die Dense-R-CHOP Therapiegruppe zeigte einheitliche –also kontinuierlich steigenden oder fallenden- Konzentrationsverläufe von Cathelicidin. Die Arbeitshypothese, dass sich kontinuierlich steigende bzw. fallende Cathelicidinkonzentrationen messen lassen, konnte nicht bestätigt werden. Vermutlich eignet sich Cathelicidin nicht als Marker der ADCC im Verlauf einer Immunchemotherapie.

Eine Ursache für die uneinheitlichen Verläufe der Cathelicidinkonzentration ist aufgrund der geringen Fallzahl schwer zu beschreiben. Ein Störfaktor der Messung des Cathelicidins könnte durch die Freisetzung aus Neutrophilen Granulozyten (0,60 µg 10⁶ Zelle) bedingt sein, aber auch in Monozyten, T-Zellen und in Mastzellen wird Cathelicidin gespeichert⁹⁹. Cathelicidin in seiner aktiven Peptidform wirkt nicht nur antibakteriell, antiviral oder antifugal, sondern kann auch chemotaktisch wirken und die Produktion verschiedener Zytokine und weiterer Immunzellen stimulieren^{100,101}. Niyonsaba et al. berichten, dass Cathelicidin selbst Mastzellen und ihre Degranulation stimuliert^{102,103}. Sie werden aktiviert, schütten gespeicherte Granula und pro-inflammatorische Mediatoren wie Histamin oder Prostaglandine aus, erhöhen die Gefäßpermeabilität und unterstützen die Immunzellinfiltration^{89,102,104}. Zusätzlich werden durch die Degranulation noch weitere gespeicherte Cathelicidinmengen ausgeschüttet¹⁰³. Durch veränderte Zytokinkonzentrationen im Gewebe, durch vermehrten Zelluntergang und/oder durch Infektionen werden zusätzlich weitere Immunzellen wie neutrophile Granulozyten, NK-Zellen, Makrophagen oder Mastzellen angelockt und aktiviert. Es ist möglich, dass die Cathelicidinkonzentration nicht nur durch die Granulaausschüttung der NK-Zellen während der ADCC, sondern auch durch weitere Immunzellen sowie durch das Zellmilieu beeinflusst wird⁸⁹. Je nach

Menge der zusätzlichen Immunzellen, welche durch die Therapie oder durch andere beschriebene Faktoren aktiviert werden, können die gemessenen Cathelicidinwerte beeinflusst werden. Dass dieses einen Einfluss auf die in dieser Arbeit gemessenen Cathelicidinkonzentrationen genommen haben könnte, ist bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen.

Es ist zu beachten, dass die Patienten, die an der RICOVER-60 Studie teilnahmen, eine zusätzliche Therapie mit einem Granulozyten-stimulierenden-Faktor (G-CSF) erhielten. Eine G-CSF Therapie führt unter anderem zu einer Stimulation von hämatopoetischen Vorläuferzellen und zur Proliferation von vor allem neutrophilen Granulozyten. Zusätzlich werden bereits reife neutrophile Granulozyten durch G-CSF-Rezeptoren aktiviert und chemotaktisch zum Infektionsherd gelockt ^{105,106}. G-CSF kann als Medikament zur Immunochemotherapie bei aggressiven Lymphomen gegeben werden, um die Anzahl der neutrophilen Granulozyten, welche durch die Chemotherapie reduziert werden, zu erhöhen und febrile Neutropenie, schwere Infektionen und durch sie bedingte Hospitalisierungen und Therapieverzögerungen vorzubeugen ¹⁰⁶. Neben den NK-Zellen, die während der ADCC aktiviert werden, sind durch den G-CSF nicht nur eine vermehrte Anzahl von neutrophilen Granulozyten vorhanden, sondern kommt auch zu einer vermehrten Stimulation und Aktivität der Zellen während der Therapie ¹⁰⁶. Es ist vorstellbar, dass Cathelicidin in größeren Mengen aus den stimulierten neutrophilen Granulozyten freigesetzt wird. Die hohen Konzentrationen von Cathelicidin während der Therapie an allen untersuchten Therapietagen des Patienten mit der ID 1400 aus der RICOVER-60 Studie, welcher eine zusätzliche G-CSF Therapie erhielt, könnte für einen Einfluss von G-CSF auf die Cathelicidinkonzentration sprechen. Dieser Patient hatte die höchste Cathelicidin-Durchschnittskonzentration während der Therapie. Auch der Patient mit der ID 1402 erhielt eine zusätzliche G-CSF Therapieunterstützung. In der Serumprobe am Therapietag 29 konnte die höchste Cathelicidinkonzentration der in dieser Arbeit untersuchten Proben im gesamten Therapieverlauf gemessen werden. Fast alle Proben der beiden Patienten (ID 1400 und ID 1402) hatten höhere Cathelicidinkonzentrationen als die durchschnittliche Cathelicidinkonzentration am jeweiligen Therapietag. Entgegen dem eben dargestellten positiven Konzentrationsverlauf von Cathelicidin der beiden Patienten waren die Messwerte des Patienten mit der ID 1401. Die ersten beiden gemessenen Proben von Tag 1 und Tag 15 der Therapie zeigten nur niedrige, im Vergleich zum Gesamtdurchschnitt aller gemessenen Serumproben am jeweiligen Therapietag sogar unterdurchschnittlich niedrige Werte auf. Ob der G-CS Faktor einen direkten Einfluss auf die gemessenen Cathelicidinkonzentrationen genommen hat oder ob die Cathelicidinkonzentrationen durch den G-CS Faktor verändert worden sind, kann aus den ermittelten Daten nicht beschrieben werden. Dieses sollte jedoch bei der Interpretation der Ergebnisse beachtet werden. Aufgrund der nur geringen Anzahl der untersuchten seriellen Serumproben aus der RICOVER-60 Studie kann keine eindeutige Schlussfolgerung über den Einfluss des G-CS Faktors auf die Cathelicidinkonzentration gezogen werden. Gegebenenfalls müsste

Cathelicidin aus EDTA Vollblut frisch bestimmt werden, da bei der Gewinnung von Serum und dem Einfrieren neutrophile Granulozyten lysiert und so Cathelicidin freigesetzt werden könnte. Alternativ könnten auch LL-37 mRNA nach Zellseparation in den einzelnen Zelltypen bestimmt werden.

Interessant ist der Vergleich der Cathelicidinkonzentrationen der Dense-R-CHOP und der Standard-R-CHOP-Therapiegruppe im Verlauf der Therapie. Aufgrund der zeitlich intensivierten Rituximabgaben in der Dense-R-CHOP Therapiegruppe erwarteten wir, dass durch die höheren Rituximabkonzentrationen während des Therapiezeitraumes eine vermehrte Anzahl von Effektorzellen stimuliert und aktiviert werden und eine entsprechend höhere Cathelicidinmenge ausgeschüttet und eine höhere Cathelicidinkonzentration zu messen sein müsste. Diese Annahme konnte mit den in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen nicht bestätigt werden. Im Gegensatz dazu zeigte die Standard-R-CHOP Therapiegruppe im Vergleich zur Dense-R-CHOP Therapiegruppe an allen untersuchten Therapietagen signifikant höhere Durchschnittskonzentrationen. Zusätzlich war in der Standard-R-CHOP Therapiegruppe die höchste Cathelicidinkonzentration aller untersuchten Proben zu messen. Ein Vergleich und eine mögliche Interpretation für diese Ergebnisse sind aufgrund der bis dato sehr geringen Datenlagen von Cathelicidin und NHL nur schwer möglich. Es ist jedoch zu diskutieren, ob das Maximum der durch NK-Zellen ausgelösten ADCC bereits frühzeitig in der Rituximabtherapie erreicht wird. Durch eine zeitliche Intensivierung der Rituximabtherapie kann die individuelle Cathelicidinfreisetzung durch Effektorzellen sowie seine Wirkung nicht weiter stimuliert werden. Auch eine Beeinflussung der freigesetzten Cathelicidinmenge durch die zusätzliche G-CSF Therapie sollte bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Mittels des Pearson Korrelationskoeffizienten wurde nur ein mäßiger linearer Zusammenhang zwischen der Cathelicidinkonzentration an Tag 1 der Therapie und dem durchschnittlichen Verlauf der Cathelicidinkonzentration in den gemessenen Zeiträumen berechnet. Ein Zusammenhang zum Verlauf der Cathelicidinkonzentration während der Therapie und der Startkonzentration von Cathelicidin von Tag 1 der Therapie konnte nicht ermittelt werden. Die Anzahl der stimulierten Effektorzellen und die damit ausgeschüttete Cathelicidinkonzentration am Anfang der Therapie stehen nur „schwach“ im Zusammenhang mit der stimulierten Effektorzellanzahl während des Therapieverlaufes. Eine vermutete stärker stimulierte ADCC während der Therapie durch eine hohe Anzahl stimulierter Effektorzellen am Anfang der Therapie ließ sich mit dieser Arbeit nicht bestätigen.

In der Arbeit lag der Mittelwert aller Cathelicidinmessungen der untersuchten Proben bei 10,14 ng/ml. In der Literatur werden derzeit keine Normbereiche beschrieben. Gombart et al. beschreiben Cathelicidinkonzentrationen im Bereich 650 ± 343 ng/ml, in einer anderen Studie werden Cathelicidin-Konzentrationswerte vom $49,5 \pm 23,8$ ng/ml beschrieben^{92,104}. Der große Unterschied der Messwerte lässt sich durch unterschiedliche Messmethoden erklären. Die Studien verwenden unterschiedliche

und nicht standardisierte Untersuchungsmethoden. Auch die unterschiedliche Gewinnung, Verarbeitung und der unterschiedliche Transport können Einfluss auf die Cathelicidinkonzentration nehmen. In dieser Arbeit wurden standardisierte Verfahren und einheitliche Messpakete zur Bestimmung von Cathelicidinkonzentrationen der Firma HycultBiotech verwendet. Eine interne Vergleichbarkeit der Ergebnisse in dieser Arbeit ist gegeben. Auch durchgeführte Stichprobenkontrollen einzelner Proben zur Überprüfung der Cathelicidinkonzentrationen durch den Einsatz neuer Chargen der Firma HycultBiotech zeigten keine Konzentrationsabweichungen >10% und sprechen für eine valide Versuchsreihe.

In der Diskussion zu Cathelicidinkonzentrationen und ihrer Interpretation sollte beachtet werden, dass Cathelicidin in unterschiedlichen Gewebe nachzuweisen ist. Je nach Gewebe kann Cathelicidin eine andere Wirkung bzw. einen anderen Einfluss auf das Gewebe nehmen. Zum Beispiel zeigten Cathelicidin Knockout-Mäusen, denen Melanomgewebe implantiert wurden, ein verstärktes Tumorstadium⁸⁷. Auch in normaler Kolonmukosa lässt sich eine Cathelicidinexpression nachweisen. In Kolon-Malignomgewebe lässt sich eine „Runterregulation“ des Proteins und damit verringerte Cathelicidinkonzentrationen nachweisen. Anders verhält sich das Protein in malignem Ovargewebe. Hier konnte eine verstärkte Expression von Cathelicidin im Tumorgewebe gemessen werden. Eine verstärkte Tumorstadium und eine verstärkte Angiogenese des Tumors werden im Zusammenhang mit einer verstärkten Expression von Cathelicidin in malignem Ovargewebe beschrieben¹⁰⁷. Geringe Konzentrationen von Cathelicidin konnten in malignem lymphatischem Gewebe (Burkitt Lymphom) nachgewiesen werden^{97,108}.

Bei der Interpretation der Ergebnisse ist zu beachten, dass nur eine begrenzte Anzahl von seriellen Serumproben zu den Therapiezeitpunkten, die in dieser Arbeit untersucht worden sind, vorhanden war. Aufgrund des kleinen Stichprobenumfangs sowie der nicht einheitlich verlaufenden Cathelicidinkonzentrationen ist es schwierig zu sagen, ob es keine relevante Steigerung bzw. einheitliche Verläufe der Cathelicidinkonzentration gibt oder ob diese aufgrund des Stichprobenumfangs nur nicht nachgewiesen konnte. Um eine möglicherweise steigende Cathelicidinkonzentration während der Therapie nachweisen zu können, bedarf es gegebenenfalls ein größeres Untersuchungskollektiv. Neben einer eingeschränkten Anzahl an Serumproben zu bestimmten Zeitpunkten der Therapie muss diskutiert werden, ob die Proben im Rahmen der Studie eventuell unter unterschiedlichen Bedingungen entnommen, gesammelt und transportiert worden sind.

In dieser Arbeit fungiert das Protein Cathelicidin nicht als direkter biologischer Marker für die durch NK-Zellen eingeleitete ADCC. Es kann sein, dass andere Faktoren im Zusammenhang mit NHL Erkrankungen und einer Immunochemotherapie einen Einfluss auf die Cathelicidinkonzentrationen haben. Zusätzlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass nicht messbare Faktoren, wie

unterschiedliche Lagerung und Transport, eine Rolle spielen. Weitere Möglichkeiten zur Bestimmung von Cathelicidinkonzentrationen wären Messungen von Cathelicidin zum Beispiel in Li-Heparin Plasma oder EDTA Vollblut. Dadurch könnte eine Freisetzung von Cathelicidin aus neutrophilen Granulozyten reduziert werden. Ein möglicher Einfluss auf die in dieser Arbeit gemessenen Cathelicidinkonzentrationen könnte verringert werden.

Eine Messung der LL-37 mRNA und eine Messung der peripheren Cathelicidinkonzentration würden Hinweise auf den Anteil äußerer Einflüsse auf die zu messende Cathelicidinkonzentration bringen.

Die Cathelicidinmessungen dieser Arbeit lassen keine eindeutige Schlussfolgerung, dass Cathelicidin als Marker für die ADCC in Patienten mit aggressivem B-Zell-Lymphom geeignet ist, zu.

5.2 Cathelicidinmessungen und Patientencharakteristika

Das durchschnittliche Erkrankungsalter der Patienten in dieser Arbeit lag bei 63,2 Jahren, da Patienten aus einer Studie für Patienten im Alter von 18-60 Jahren eingeschlossen wurden (UNFOLDER). Das Durchschnittsalter bei DLBCL Patienten in Deutschland liegt bei etwas unter 70 Jahren.

13 (87%) der 15 Patienten hatten eine vollständige Remission. Zwei Patienten hatten im Studienverlauf ein Rezidiv. Die Studienteilnehmerin mit der ID 18 erkrankte ca. fünf Jahre nach Therapieende an einem Rezidiv. Sie erhielt Rituximabinfusionen in einem 14-tägigen Zeitintervall (Dense-R-CHOP; 6x CHOP-14/12xR). Bei den gemessenen Cathelicidinkonzentrationen der Patientin fällt auf, dass die Cathelicidinkonzentrationen während der Therapie im Durchschnitt fallen (-39,7%). Die Abnahme der Cathelicidinkonzentration im Therapieverlauf ist bei keinem anderen Patienten stärker. Die einzelnen Cathelicidinkonzentrationen (4,1 - 8,3 ng/ml) der Patientin im Therapieverlauf sind im Vergleich der Cathelicidinkonzentrationen der anderen Patientin niedrig. Die höchste Cathelicidinkonzentration mit 8,3 ng/ml ist niedriger als alle anderen Cathelicidinkonzentration im gesamten Therapieverlauf. Ob ein Zusammenhang zwischen den niedrigen Cathelicidinkonzentrationen und dem Rezidiv der Patientin besteht, ist aufgrund des Einzelfalles schwer zu beurteilen. Die Patientin mit der ID 169 hatte ca. drei Jahre nach Therapieende ein Rezidiv. Die Rituximabgabe wurde in keinem intensivierten Zeitintervall infundiert. Die Cathelicidinkonzentrationen der Patientin variierten im Therapieverlauf zwischen 8,53 ng/ml und 11,6 ng/ml und die Konzentration nahm im Therapieverlauf durchschnittlich um 2,3% ab. Damit unterscheidet sich die Patientin von dem übrigen Untersuchungskollektiv, welches eine durchschnittliche Zunahme der Cathelicidinkonzentration im Therapieverlauf zeigt (+5,91%). Beide Patienten zeigten eine durchschnittlich fallende Cathelicidinkonzentration im Therapieverlauf. Insgesamt zeigten 5 der 15 Patienten in dieser Arbeit eine fallende Cathelicidinkonzentration im Therapieverlauf. 2 der 5 Patienten hatten im Kontrollzeitraum nach Therapieende ein spätes (>1 Jahr) Rezidiv.

5.3 Cathelicidinkonzentrationen im Zusammenhang der gemessenen Vitamin-D-Konzentrationen

Vitamin-D, 1,25 Dihydroxyvitamin-D₃ (1,25 OH₂D₃), ist ein Modulator des Immunsystems. Durch Bindung an spezifische DNA-Sequenzen, sogenannte Vitamin-D-Response-Elemente, kann 1,25 OH₂D₃ die Transkription verschiedener Proteine beeinflussen. Die Promotoren des antimikrobiellen Peptides (Camp) enthalten Vitamin-D-Rezeptoren, welche eine 1,25 OH₂D₃ abhängige Genexpression vermitteln. Die Cathelicidinexpression wird so zum Beispiel in Monozyten, in Keratinozyten, in neutrophilen Granulozyten oder in NK-Zellen induziert ⁶⁷. Die Vitamin-D-Konzentration wurde in den Proben an Tag 1 der Therapie bestimmt.

In dieser Arbeit wurde überprüft, ob ein linearer Zusammenhang zwischen gemessenen Vitamin-D-Konzentrationen an Tag 1 der Therapie und der Cathelicidinkonzentration an Tag 1 oder dem Verlauf der Cathelicidinkonzentration während der Therapie besteht. Eine Korrelation dieser Variablen würde für einen Einfluss von Vitamin-D auf die zu messende Cathelicidinkonzentration sprechen.

Der durchschnittliche Vitamin-D-Serumspiegel variierte in den Proben zwischen 21,4 ng/ml und einem nicht messbaren Wert <4 ng/ml. Der Mittelwert der gemessenen Vitamin-D-Konzentration lag bei 8,95 ng/ml und liegt mit diesem Wert im Definitionsbereich eines Vitamin-D-Mangels. Es zeigte sich, dass die Mehrheit der untersuchten Patientenproben ungenügende Vitamin-D-Konzentrationen aufwiesen (< 30 ng/ml). Auch andere Studien konnten eine häufig ungenügende Vitamin-D-Versorgung in gesunden als auch in hospitalisierten Patienten zeigen und bestätigen die ermittelten Daten ^{4,8,109,110}.

Eine Korrelation zwischen Vitamin-D und den gemessenen Cathelicidinkonzentrationen wurde mittels des Pearsons Korrelationskoeffizienten geprüft. Für die Cathelicidinkonzentration an Tag 1 und dem durchschnittlichen Verlauf der Cathelicidinkonzentration der Patientin zeigte sich nur ein geringer linearer Zusammenhang. Die Startkonzentrationen von Cathelicidin am Anfang der Therapie haben nur einen geringen Einfluss auf die Cathelicidinkonzentration während der Therapie.

Ein Zusammenhang zwischen der Vitamin-D-Konzentration und dem Verlauf der Cathelicidinkonzentration während der Therapie konnte nicht gemessen werden. Beide Variablen verhalten sich unabhängig voneinander. Verschiedene Studien bestätigen diese Ergebnisse. Auch Yamshchikov oder Adams et al. konnten keinen linearen Zusammenhang zwischen der Vitamin-D-Konzentrationen und dem Verlauf von Cathelicidinkonzentrationen feststellen ^{111–113}.

Zu diskutieren ist, ob die weit verbreiteten ungenügenden Vitamin-D-Konzentrationen bereits einen Einfluss auf die Ausgangskonzentration und auf die gesamte Cathelicidinentwicklung während der Therapie haben. Alle untersuchten Proben zeigten eine unzureichende Vitamin-D-Versorgung, der größte Teil der untersuchten Proben zeigte Werte im Bereich eines Vitamin-D-Mangels (≤ 10 ng/ml). Untersuchungen zu Cathelicidinkonzentrationen bei Patienten mit suffizienten Vitamin-D-Konzentrationen konnten in dieser Arbeit aufgrund der begrenzten Anzahl der seriellen Serumproben nicht untersucht werden. Eine positive Korrelation zwischen der Cathelicidinkonzentration und

Vitamin-D-Konzentration konnte in einer Studie mit knapp 20 gesunden Probanden gezeigt werden ¹¹⁴. Aufgrund der doch kleinen Probandengruppe und der Vitamin-D-Konzentrationseinschränkung ≤ 32 ng/ml handelt es sich aber eher um eine kleine Studie mit begrenzter Aussagekraft.

Eine Studie von Bruns et al. untersuchte Cathelicidinkonzentrationen in gesunden Probanden vor und nach Vitamin-D-Behandlung. Gesunde Probanden mit niedrigen Vitamin-D-Serumkonzentrationen erhielten eine Vitamin-D-Supplementation mit 40.000 IE 25-OH Vitamin-D für 6 Wochen. Die in dieser Studie untersuchten Makrophagen, welche ebenfalls Cathelicidin exprimieren, zeigten nach Vitamin-D-Supplementation eine signifikant höhere Cathelicidin mRNA Expression im Vergleich vor Vitamin-D-Supplementation. Auch eine höhere Anzahl an Vitamin-D-Rezeptoren war nach Vitamin-D-Supplementation zu messen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die ADCC via Cathelicidin bei DLBCL Patienten durch tumorassoziierte Makrophagen in vitro durch Vitamin-D-Supplementation gesteigert werden konnte ¹⁰⁸. Diese experimentelle Arbeit von Bruns et al. fand Hinweise darauf, tumor-assoziierte Makrophagen in NHL (DLBCL) Vitamin-D abhängig Cathelicidin freisetzen. Jedoch muss beachtet werden, dass nach derzeitigem Wissen vor allem NK-Zellen als Haupteffektorzellen der ADCC bekannt sind. NK-Zellen sind jedoch nur selten im aggressiven NHL Gewebe nachzuweisen ¹¹⁵.

Bruns et al. beschreiben, dass aggressive Lymphome mittels CYP24A1 aktives Calcitriol und Calcidiol hydroxylieren und so inaktivieren können. Dadurch wird eine Vitamin-D-arme Tumorumgebung geschaffen. Über die Produktion des CYP-Proteins kann die Cathelicidininduktion reduziert werden ¹⁰⁸. Eine verstärkte CYP24A1 Expression konnte in verschiedenen Tumorarten, wie zum Beispiel in Pankreaskarzinom, Lungenkarzinom, Kolonkarzinom sowie in NHL nachgewiesen werden ^{68,116}. Wie CYP24A1 reguliert wird und welchen Einfluss es in der Tumorphogenese und -proliferation von NHL spielt, ist derzeit noch unklar und muss in weiteren Studien untersucht werden. Interessant zur Erweiterung dieser Arbeit wäre eine Untersuchung der Cathelicidin-Promotoraktivität, der Transkriptionsrate der Cathelicidin-mRNA und der tatsächlich nachweisbaren Cathelicidinkonzentration – zusätzlich zur Betrachtung der Vitamin-D-Konzentration. Eine 1,25 Hydroxyvitamin-D vermittelte Expression von pro-LL37 konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden ¹¹⁷. Es ist möglich, dass auf mRNA Ebene eine verstärkte Pro-Cathelicidinproduktion bei höheren Vitamin-D-Konzentrationen nachzuweisen ist, dieses jedoch durch Messungen der Cathelicidinkonzentration in Proben nicht zu detektieren ist. Ähnliche Ergebnisse konnte in Studien zu Cathelicidin und der Hauterkrankung Psoriasis gezeigt werden ¹¹⁸.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die vorliegenden Ergebnisse keinen Zusammenhang zwischen Cathelicidinkonzentrationen bei DLBCL Patienten und Vitamin-D-Konzentrationen herstellen lassen. Ob sich Vitamin-D und/oder Cathelicidin LL-37 als prognostische Faktoren eignen, muss in weiterführenden Studien mit größerer Probandenzahl oder durch andere Messmethoden untersucht werden.

Literaturverzeichnis

1. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;289(1):F8-28. doi:10.1152/ajprenal.00336.2004.
2. Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*. 2004;80(6 Suppl):1678S-88S. doi:10.1093/ajcn/80.6.1678S.
3. Baggerly CA, Cuomo RE, French CB, et al. Sunlight and Vitamin D: Necessary for Public Health. *J Am Coll Nutr*. 2015;34(4):359-365. doi:10.1080/07315724.2015.1039866.
4. Thomas MK, Lloyd-Jones DM, Thadhani RI, et al. Hypovitaminosis D in medical inpatients. *N Engl J Med*. 1998;338(12):777-783. doi:10.1056/NEJM199803193381201.
5. Hossein-nezhad A, Holick MF. Vitamin D for health: a global perspective. *Mayo Clin Proc*. 2013;88(7):720-755. doi:10.1016/j.mayocp.2013.05.011.
6. Garland C, Barrett-Connor E, Rosssof A, Shekelle R, Criqui M, Paul O. DIETARY VITAMIN D AND CALCIUM AND RISK OF COLORECTAL CANCER: A 19-YEAR PROSPECTIVE STUDY IN MEN. *Lancet*. 1985;325(8424):307-309. doi:10.1016/S0140-6736(85)91082-7.
7. Peterlik M, Cross HS. Vitamin D and calcium deficits predispose for multiple chronic diseases. *Eur J Clin Invest*. 2005;35(5):290-304. doi:10.1111/j.1365-2362.2005.01487.x.
8. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, et al. Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. <http://dx.doi.org/101210/jc2011-0385>. 2011.
9. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 2007;357(3):266-281. doi:10.1056/NEJMr070553.
10. Hazardous Substances Data Bank. TOXNET. 18.01.2017. <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@rn+@rel+67-97-0>. Accessed January 18, 2017.
11. Issa LL, Leong GM, Eisman JA. Molecular mechanism of vitamin D receptor action. *Inflamm Res*. 1998;47(12):451-475. doi:10.1007/s000110050360.
12. Hyppönen E, Läärä E, Reunanen A, Järvelin M-R, Virtanen SM. Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet*. 2001;358(9292):1500-1503. doi:10.1016/S0140-6736(01)06580-1.
13. Wang T-T, Tavera-Mendoza LE, Laperriere D, et al. Large-scale in silico and microarray-based identification of direct 1,25-dihydroxyvitamin D3 target genes. *Mol Endocrinol*. 2005;19(11):2685-2695. doi:10.1210/me.2005-0106.
14. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molekularbiologie Der Zelle*. Wiley-

VCH; 2011.

15. Clifford J Rosen MD. Vitamin D Insufficiency. *N Engl J Med*. 2011.
doi:10.1056/NEJMc1101911#SA4.
16. Gallagher JC, Sai AJ. Vitamin D insufficiency, deficiency, and bone health. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(6):2630-2633. doi:10.1210/jc.2010-0918.
17. MATSUOKA LY, IDE L, WORTSMAN J, MACLAUGHLIN JA, HOLICK MF. Sunscreens Suppress Cutaneous Vitamin D₃ Synthesis*. *J Clin Endocrinol Metab*. 1987;64(6):1165-1168.
doi:10.1210/jcem-64-6-1165.
18. Clemens TL, Adams JS, Henderson SL, Holick MF. Increased skin pigment reduces the capacity of skin to synthesise vitamin D₃. *Lancet (London, England)*. 1982;1(8263):74-76.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6119494>. Accessed December 5, 2016.
19. WEBB AR, KLINE L, HOLICK MF. Influence of Season and Latitude on the Cutaneous Synthesis of Vitamin D₃ : Exposure to Winter Sunlight in Boston and Edmonton Will Not Promote Vitamin D₃ Synthesis in Human Skin*. *J Clin Endocrinol Metab*. 1988;67(2):373-378.
doi:10.1210/jcem-67-2-373.
20. Need AG, Morris HA, Horowitz M, Nordin C. Effects of skin thickness, age, body fat, and sunlight on serum 25-hydroxyvitamin D. *Am J Clin Nutr*. 1993;58(6):882-885.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8249872>. Accessed December 5, 2016.
21. Naeem Z. Vitamin d deficiency- an ignored epidemic. *Int J Health Sci (Qassim)*. 2010;4(1):V-VI.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21475519>. Accessed July 25, 2016.
22. Robert Koch Institut, GEKID. *Krebs in Deutschland 2011/2012*. Berlin; 2015.
23. Schilling S. Epidemic vitamin D deficiency among patients in an elderly care rehabilitation facility. *Dtsch Ärzteblatt Int*. 2012;109(3):33-38. doi:10.3238/arztebl.2012.0033.
24. Vanicek K, Thomas F, Litynska Z, Schmalwieser A. References CIE (1987): A reference action spectrum for ultraviolet induced erythema in human skin. *CIE Res Note CIE J Greiter F*. 1984;6:17-22. https://kunden.dwd.de/uvi/data/www_UV_dose.pdf. Accessed October 22, 2017.
25. Bittenbring JT, Neumann F, Altmann B, et al. Vitamin D Deficiency Impairs Rituximab-Mediated Cellular Cytotoxicity and Outcome of Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With but Not Without Rituximab. *J Clin Oncol*. 2014;32(29):3242-3248.
doi:10.1200/JCO.2013.53.4537.
26. Tiemann M, Trümper L. Pathologie, Biologie und Klassifikation malignen Non-Hodgkin-Lymphome. *Der Onkol*. 2001;7(9):940-959. doi:10.1007/s007610170043.
27. Stein H, Hiddemann W. Die neue WHO-Klassifikation der malignen Lymphome. *Dtsch Aerzteblatt*.

28. Jiang M, Bennani NN, Feldman AL. Lymphoma classification update: B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Expert Rev Hematol*. 2017;10(5):405-415. doi:10.1080/17474086.2017.1318053.
29. Swerdlow SH. Lymphoma classification and the tools of our trade: an introduction to the 2012 USCAP Long Course. *Mod Pathol*. 2013;26:S1-S14. doi:10.1038/modpathol.2012.177.
30. Hiddemann W, Stein H. Die neue WHO-Klassifikation der malignen Lymphome: Endlich eine weltweit akzeptierte Einteilung. *Dtsch Ärzteblatt*. <http://www.aerzteblatt.de/archiv/20323>.
31. Deutsches Krebsforschungszentrum und Krebsinformationsdienst. Lymphome; Statistik: Wie häufig sind Lymphome? Lymphome. <https://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/lymphome/ueberblick.php#inhalt16>. Published 2011.
32. Martelli M, Ferreri AJM, Agostinelli C, Di Rocco A, Pfreundschuh M, Pileri SA. Diffuse large B-cell lymphoma. *Crit Rev Oncol / Hematol*. 2013;87:146-171. doi:10.1016/j.critrevonc.2012.12.009.
33. Prinz C. *Basiswissen Innere Medizin, Kapitel 17, Seite 325 - 345*.
34. Herold G. *Innere Medizin, Kapitel 1 Hämatologie: Maligne Lymphome, Seite 65 -83*. Koeln: Deutsche Nationalbibliothek
35. Cunningham D, Hawkes EA, Jack A, et al. Rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone in patients with newly diagnosed diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma: a phase 3 comparison of dose intensification with 14-day versus 21-day cycles. *Lancet*. 2013;381(9880):1817-1826. doi:10.1016/S0140-6736(13)60313-X.
36. Gorczyca W. *Prognostic Markers in Hematologic Oncology - Wojciech Gorczyca - Google Books*. <https://books.google.de/books?id=7bfYvJyLbUIC&pg=PA3&dq=IPI+NHL&hl=de&sa=X&ved=0ahUKEwir64byyajQAhWKuRQKHQz2D5EQ6AEINjAC#v=onepage&q=IPI+NHL&f=false>.
37. Shipp MA, Harrington DP, Anderson JR, et al. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med*. 1993;329(14):987-994. doi:10.1056/NEJM199309303291402.
38. Zhou Z, Sehn LH, Rademaker AW, et al. An enhanced International Prognostic Index (NCCN-IPI) for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the rituximab era. *Blood*. 2014;123(6):837-842. doi:10.1182/blood-2013-09-524108.
39. Bassig BA, Lan Q, Rothman N, Zhang Y, Zheng T. Current understanding of lifestyle and environmental factors and risk of non-hodgkin lymphoma: an epidemiological update. *J Cancer Epidemiol*. 2012;2012:978930. doi:10.1155/2012/978930.
40. Rubinstein PG, Aboulafia DM, Zloza A. Malignancies in HIV/AIDS: from epidemiology to therapeutic challenges. *AIDS*. 2014;28(4):453-465. doi:10.1097/QAD.000000000000071.

41. KÖHLER G, MILSTEIN C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975;256(5517):495-497. doi:10.1038/256495a0.
42. Liu JKH. The history of monoclonal antibody development - Progress, remaining challenges and future innovations. *Ann Med Surg*. 2014;3(4):113-116. doi:10.1016/j.amsu.2014.09.001.
43. Natsume A, Niwa R, Satoh M. Improving effector functions of antibodies for cancer treatment: Enhancing ADCC and CDC. *Drug Des Devel Ther*. 2009;3:7-16.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19920917>. Accessed November 17, 2016.
44. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol*. 2014;5:520. doi:10.3389/fimmu.2014.00520.
45. Nadler LM, Roberts WC. Lee Marshall Nadler, MD: a conversation with the editor. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*. 2007;20(4):381-389. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17948113>. Accessed November 28, 2016.
46. Nadler LM, Ritz J, Hardy R, Pesando JM, Schlossman SF, Stashenko P. A unique cell surface antigen identifying lymphoid malignancies of B cell origin. *J Clin Invest*. 1981;67(1):134-140. doi:10.1172/JCI110005.
47. Stashenko P, Nadler LM, Hardy R, Schlossman SF. Expression of cell surface markers after human B lymphocyte activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78(6):3848-3852.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6973760>. Accessed November 28, 2016.
48. Coiffier B, Lepage E, Briere J, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2002;346(4):235-242. doi:10.1056/NEJMoa011795.
49. Feuring-Buske M, Kneba M, Unterhalt M, et al. (Rituximab) anti-CD20 antibody treatment in relapsed advanced-stage follicular lymphomas. *Ann Hematol*. 2000;79(9):493-500.
<http://web.a.ebscohost.com/abstract?direct=true&profile=ehost&scope=site&authtype=crawler&jrnl=09395555&AN=15684621&h=q6CIHV1Vp%2B30kaux%2BjziM%2BKl7V1dVx5UeDxo0aIEqR%2BwEMSIE%2BZYppvbl9UCs2gURYyWViWyPbRcZIkKM62A%3D%3D&url=f&resultNs=AdminWebAuth&result>. Accessed October 30, 2017.
50. Habermann TM, Weller EA, Morrison VA, et al. Rituximab-CHOP versus CHOP alone or with maintenance rituximab in older patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2006;24(19):3121-3127. doi:10.1200/JCO.2005.05.1003.
51. Pfreundschuh M, Trümper L, Osterborg A, et al. CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MINT) Group. *Lancet Oncol*. 2006;7(5):379-391. doi:10.1016/S1470-2045(06)70664-7.
52. Pfreundschuh M, Schubert J, Ziepert M, et al. Six versus eight cycles of bi-weekly CHOP-14

- with or without rituximab in elderly patients with aggressive CD20+ B-cell lymphomas: a randomised controlled trial (RICOVER-60). *Lancet Oncol*. 2008;9(2):105-116. doi:10.1016/S1470-2045(08)70002-0.
53. Salmon JE, Edberg JC, Brogle NL, Kimberly RP. Allelic polymorphisms of human Fc gamma receptor IIA and Fc gamma receptor IIIB. Independent mechanisms for differences in human phagocyte function. *J Clin Invest*. 1992;89(4):1274-1281. doi:10.1172/JCI115712.
 54. Uchida J, Lee Y, Hasegawa M, et al. Mouse CD20 expression and function. *Int Immunol*. 2004;16(1):119-129. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14688067>. Accessed November 23, 2016.
 55. Lim SH, Beers SA, French RR, Johnson PWM, Glennie MJ, Cragg MS. Anti-CD20 monoclonal antibodies: historical and future perspectives. *Haematologica*. 2010;95(1):135-143. doi:10.3324/haematol.2008.001628.
 56. Reff ME, Carner K, Chambers KS, et al. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood*. 1994;83(2):435-445. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7506951>. Accessed July 26, 2016.
 57. Vose JM, Link BK, Grossbard ML, et al. Phase II study of rituximab in combination with chop chemotherapy in patients with previously untreated, aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 2001;19(2):389-397. doi:10.1200/jco.2001.19.2.389.
 58. Dotan E, Aggarwal C, Smith MR. Impact of Rituximab (Rituxan) on the Treatment of B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. *P T*. 2010;35(3):148-157. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20442809>. Accessed November 28, 2016.
 59. Coiffier B. Rituximab therapy in malignant lymphoma. *Oncogene*. 2007;26(25):3603-3613. doi:10.1038/sj.onc.1210376.
 60. Drake MT, Maurer MJ, Link BK, et al. Vitamin D insufficiency and prognosis in non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 2010;28(27):4191-4198. doi:10.1200/JCO.2010.28.6674.
 61. Janas E, Janas E, Priest R, Wilde JI, White JH, Malhotra R. Clinical and Experimental Immunology Rituxan (anti-CD 20 antibody)-induced translocation of CD 20 into lipid rafts is crucial for calcium influx and apoptosis. *Immunol Clin Exp Immunol*. 139:439-446. doi:10.1111/j.1365-2249.2005.02720.x.
 62. Deans JP, Li H, Polyak MJ. CD20-mediated apoptosis: signalling through lipid rafts. *Immunology*. 2002;107(2):176-182. doi:10.1046/j.1365-2567.2002.01495.x.
 63. Monteverde M, Milano G, Strola G, et al. The relevance of ADCC for EGFR targeting: A review of the literature and a clinically-applicable method of assessment in patients. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2015;95(2):179-190. doi:10.1016/j.critrevonc.2015.02.014.
 64. Seidel UJE, Schlegel P, Lang P. Natural killer cell mediated antibody-dependent cellular

- cytotoxicity in tumor immunotherapy with therapeutic antibodies. *Front Immunol*. 2013;4(MAR):1-8. doi:10.3389/fimmu.2013.00076.
65. Campbell KS, Hasegawa J. Natural killer cell biology: An update and future directions. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(3):536-544. doi:10.1016/j.jaci.2013.07.006.
 66. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch J V. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med*. 2000;6(4):443-446. doi:10.1038/74704.
 67. Wang T, Nestel FP, Bourdeau V, et al. Inducer of Antimicrobial Peptide Gene Expression 1. 2013.
 68. Wang W, Erbe AK, Hank JA, Morris ZS, Sondel PM. NK cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in cancer immunotherapy. *Front Immunol*. 2015;6(JUL). doi:10.3389/fimmu.2015.00368.
 69. Boross P, Leusen JHW. Mechanisms of action of CD20 antibodies. *Am J Cancer Res*. 2012;2(6):676-690. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23226614>. Accessed July 26, 2016.
 70. Cartron G, Dacheux L, Salles G, et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood*. 2002;99(3):754-758. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11806974>. Accessed December 2, 2016.
 71. Manches O, Lui G, Chaperot L, et al. In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. *Blood*. 2003;101(3):949-954. doi:10.1182/blood-2002-02-0469.
 72. Rogers LM, Veeramani S, Weiner GJ. Complement in monoclonal antibody therapy of cancer. *Immunol Res*. 2014;59(1-3):203-210. doi:10.1007/s12026-014-8542-z.
 73. Idusogie EE, Wong PY, Presta LG, et al. Engineered antibodies with increased activity to recruit complement. *J Immunol*. 2001;166(4):2571-2575. doi:10.4049/JIMMUNOL.166.4.2571.
 74. Bonavida B. Postulated mechanisms of resistance of B-cell non-Hodgkin lymphoma to rituximab treatment regimens: strategies to overcome resistance. *Semin Oncol*. 2014;41(5):667-677. doi:10.1053/j.seminoncol.2014.08.006.
 75. Kennedy AD, Beum P V, Solga MD, et al. Rituximab infusion promotes rapid complement depletion and acute CD20 loss in chronic lymphocytic leukemia. *J Immunol*. 2004;172(5):3280-3288. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14978136>. Accessed December 10, 2016.
 76. Macor P, Tripodo C, Zorzet S, et al. In vivo Targeting of Human Neutralizing Antibodies against CD55 and CD59 to Lymphoma Cells Increases the Antitumor Activity of Rituximab. *Cancer Res*. 2007;67(21):10556-10563. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1811.
 77. Gelderman KA, Kuppen PJK, Okada N, Fleuren GJ, Gorter A. Tumor-Specific Inhibition of Membrane-Bound Complement Regulatory Protein Crry with Bispecific Monoclonal Antibodies Prevents Tumor Outgrowth in a Rat Colorectal Cancer Lung Metastases Model. *Cancer Res*. 2004;64(12):4366-4372. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-2131.

78. Treon SP, Mitsiades C, Mitsiades N, et al. Tumor cell expression of CD59 is associated with resistance to CD20 serotherapy in patients with B-cell malignancies. *J Immunother.* 24(3):263-271. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11394505>. Accessed December 10, 2016.
79. Bubien JK, Zhou LJ, Bell PD, Frizzell RA, Tedder TF. Transfection of the CD20 cell surface molecule into ectopic cell types generates a Ca²⁺ conductance found constitutively in B lymphocytes. *J Cell Biol.* 1993;121(5).
80. Janas E, Priest R, Malhotra R. Functional role of lipid rafts in CD20 activity? *Biochem Soc Symp.* 2005;(72):165-175. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15649140>. Accessed November 23, 2016.
81. Walshe CA, Beers SA, French RR, et al. Induction of Cytosolic Calcium Flux by CD20 Is Dependent upon B Cell Antigen Receptor Signaling. *J Biol Chem.* 2008;283(25):16971-16984. doi:10.1074/jbc.M708459200.
82. Petrie RJ, Deans JP. Colocalization of the B cell receptor and CD20 followed by activation-dependent dissociation in distinct lipid rafts. *J Immunol.* 2002;169(6):2886-2891. doi:10.4049/JIMMUNOL.169.6.2886.
83. Li H, Ayer LM, Lytton J, Deans JP. Store-operated cation entry mediated by CD20 in membrane rafts. *J Biol Chem.* 2003;278(43):42427-42434. doi:10.1074/jbc.M308802200.
84. Hammadi M, Pers J-O, Berthou C, Youinou P, Bordron A. A new approach to comparing anti-CD20 antibodies: importance of the lipid rafts in their lytic efficiency. *Onco Targets Ther.* 2010;3:99-109. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20616960>. Accessed November 24, 2016.
85. Boyd RS, Jukes-Jones R, Walewska R, Brown D, Dyer MJS, Cain K. Protein profiling of plasma membranes defines aberrant signaling pathways in mantle cell lymphoma. *Mol Cell Proteomics.* 2009;8(7):1501-1515. doi:10.1074/mcp.M800515-MCP200.
86. Shan D, Ledbetter JA, Press OW. Apoptosis of Malignant Human B Cells by Ligation of CD20 With Monoclonal Antibodies. *Blood.* 1998;91(5).
87. Büchau AS, Morizane S, Trowbridge J, et al. The host defense peptide cathelicidin is required for NK cell-mediated suppression of tumor growth. *J Immunol.* 2010;184(1):369-378. doi:10.4049/jimmunol.0902110.
88. van den Broek MF, Kägi D, Zinkernagel RM, Hengartner H. Perforin dependence of natural killer cell-mediated tumor control in vivo. *Eur J Immunol.* 1995;25(12):3514-3516. doi:10.1002/eji.1830251246.
89. Vandamme D, Landuyt B, Luyten W, Schoofs L. A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide. *Cell Immunol.* 2012;280(1):22-35. doi:10.1016/j.cellimm.2012.11.009.

90. Gudmundsson GH, Agerberth B, Odeberg J, Bergman T, Olsson B, Salcedo R. The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. *Eur J Biochem.* 1996;238(2):325-332.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8681941>. Accessed December 12, 2016.
91. Gutschmann T, Hagge SO, Larrick JW, Seydel U, Wiese A. Interaction of CAP18-Derived Peptides with Membranes Made from Endotoxins or Phospholipids.
92. Peters BM, Shirliff ME, Jabra-Rizk MA. Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? *PLoS Pathog.* 2010;6(10):e1001067. doi:10.1371/journal.ppat.1001067.
93. Lavery G, Gorman SP, Gilmore BF. The potential of antimicrobial peptides as biocides. *Int J Mol Sci.* 2011;12(10):6566-6596. doi:10.3390/ijms12106566.
94. Gombart AF, Borregaard N, Koeffler HP. Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *FASEB J.* 2005;19(9):1067-1077. doi:10.1096/fj.04-3284com.
95. Lopes N, Sousa B, Martins D, et al. Alterations in Vitamin D signalling and metabolic pathways in breast cancer progression: a study of VDR, CYP27B1 and CYP24A1 expression in benign and malignant breast lesions. *BMC Cancer.* 2010;10:483. doi:10.1186/1471-2407-10-483.
96. Naidoo A, Naidoo K, Yende-zuma N, Gengiah TN. NIH Public Access. 2015;19(2):161-169. doi:10.3851/IMP2701.Changes.
97. Bruns H, Büttner M, Fabri M, et al. Vitamin D–dependent induction of cathelicidin in human macrophages results in cytotoxicity against high-grade B cell lymphoma. *Sci Transl Med.* 2015;7(282).
98. Müller C, Murawski N, Wiesen MHJ, et al. The role of sex and weight on rituximab clearance and serum elimination half-life in elderly patients with DLBCL. *Blood.* 2012;119(14).
99. Sørensen O, Cowland JB, Askaa J, Borregaard N. An ELISA for hCAP-18, the cathelicidin present in human neutrophils and plasma. *J Immunol Methods.* 1997;206(1-2):53-59.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9328568>. Accessed December 22, 2016.
100. Bals R, Weiner DJ, Moscioni AD, Meegalla RL, Wilson JM. Augmentation of innate host defense by expression of a cathelicidin antimicrobial peptide. *Infect Immun.* 1999;67(11):6084-6089. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10531270>. Accessed July 24, 2016.
101. Oudhoff MJ, Blaauboer ME, Nazmi K, Scheres N, Bolscher JGM, Veerman ECI. The role of salivary histatin and the human cathelicidin LL-37 in wound healing and innate immunity. *Biol Chem.* 2010;391(5):541-548. doi:10.1515/BC.2010.057.
102. Niyonsaba F, Iwabuchi K, Someya A, et al. A cathelicidin family of human antibacterial peptide LL-37 induces mast cell chemotaxis. *Immunology.* 2002;106(1):20-26. doi:10.1046/j.1365-

2567.2002.01398.x.

103. Niyonsaba F, Someya A, Hirata M, Ogawa H, Nagaoka I. Evaluation of the effects of peptide antibiotics human beta-defensins-1/-2 and LL-37 on histamine release and prostaglandin D(2) production from mast cells. *Eur J Immunol*. 2001;31(4):1066-1075.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11298331>. Accessed January 29, 2017.
104. Dürr UHN, Sudheendra US, Ramamoorthy A. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2006;1758(9):1408-1425. doi:10.1016/j.bbamem.2006.03.030.
105. Xu S, Höglund M, Håkansson L, Venge P. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) induces the production of cytokines in vivo. *Br J Haematol*. 2000;108(4):848-853.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10792294>. Accessed January 4, 2017.
106. Kansara R, Kumar R, Seftel M. Is primary prophylaxis with granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) indicated in the treatment of lymphoma? *Transfus Apher Sci*. 2013;49(1):51-55. doi:10.1016/j.transci.2013.05.026.
107. Coffelt SB, Waterman RS, Florez L, et al. Ovarian cancers overexpress the antimicrobial protein hCAP-18 and its derivative LL-37 increases ovarian cancer cell proliferation and invasion. *Int J Cancer*. 2007;122(5):1030-1039. doi:10.1002/ijc.23186.
108. Bruns H, Büttner M, Fabri M, et al. Vitamin D-dependent induction of cathelicidin in human macrophages results in cytotoxicity against high-grade B cell lymphoma. *Sci Transl Med*. 2015;7(282):282ra47. doi:10.1126/scitranslmed.aaa3230.
109. Gordon CM, DePeter KC, Feldman HA, Grace E, Emans SJ. Prevalence of vitamin D deficiency among healthy adolescents. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2004;158(6):531-537. doi:10.1001/archpedi.158.6.531.
110. Palacios C, Gonzalez L. Is vitamin D deficiency a major global public health problem? *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014;144 Pt A:138-145. doi:10.1016/j.jsbmb.2013.11.003.
111. Yamshchikov A V, Kurbatova E V, Kumari M, et al. Vitamin D status and antimicrobial peptide cathelicidin (LL-37) concentrations in patients with active pulmonary tuberculosis. *Am J Clin Nutr*. 2010;92(3):603-611. doi:10.3945/ajcn.2010.29411.
112. Adams JS, Songyang Ren S, Liu PT, et al. Vitamin D-Directed Rheostatic Regulation of Monocyte Antibacterial Responses. *J Immunol*. 2009. doi:182: 4289 – 4295.
113. Yang Y-M, Guo Y-F, Zhang H-S, Sun T-Y. Antimicrobial peptide LL-37 circulating levels in chronic obstructive pulmonary disease patients with high risk of frequent exacerbations. *J Thorac Dis*. 2015;7(4):740-745. doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2015.04.33.
114. Dixon BM, Barker T, McKinnon T, et al. Positive correlation between circulating cathelicidin antimicrobial peptide (hCAP18/LL-37) and 25-hydroxyvitamin D levels in healthy adults. *BMC*

Res Notes. 2012;5(1):575. doi:10.1186/1756-0500-5-575.

115. Ansell SM, Stenson M, Habermann TM, Jelinek DF, Witzig TE. Cd4+ T-cell immune response to large B-cell non-Hodgkin's lymphoma predicts patient outcome. *J Clin Oncol*. 2001;19(3):720-726. doi:10.1200/jco.2001.19.3.720.
116. Kelly JL, Drake MT, Fredericksen ZS, et al. Early life sun exposure, vitamin D-related gene variants, and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Causes Control*. 2012;23(7):1017-1029. doi:10.1007/s10552-012-9967-0.
117. Karlsson J, Carlsson G, Larne O, Andersson M, Putsep K. Vitamin D3 induces pro-LL-37 expression in myeloid precursors from patients with severe congenital neutropenia. *J Leukoc Biol*. 2008;84(5):1279-1286. doi:10.1189/jlb.0607437.
118. Mahil SK, Capon F, Barker JN. Update on psoriasis immunopathogenesis and targeted immunotherapy. *Semin Immunopathol*. 2016;38(1):11-27. doi:10.1007/s00281-015-0539-8.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Darstellung der Vitamin-D-Produktion und seine verschiedenen Einflüsse, DBP: Vitamin-D bindende Proteine, Wachstumsfaktor23, Angelehnt an Holick et al ⁹ .	6
Abbildung 2 Verschiedene Haupteffektorwege von Rituximab. Angelehnt an Deutsche Leukämie- & Lymphomhilfe, 2016	14
Abbildung 3 Beispiel eines Substratfarbumschwungs von blau nach gelb nach Hinzufügen der oxalhaltigen Stop-Lösung zur TMB haltigen Probenlösung. Die ersten beiden linken Reihen der Wells-Platte zeigen die angefertigten Standardreihen. Diese zeigen eine deutliche Farbabnahme nach unten (von A zu H).	29
Abbildung 4 Studiendaten der untersuchten Serumproben	35
Abbildung 5 Serumkonzentrationen von Cathelicidin in ng/ml an Tag 15 der Therapie aufgeteilt in Therapietypen	36
Abbildung 6 Serumkonzentrationen von Cathelicidin in ng/ml an Tag 29 der Therapie aufgeteilt in Therapietypen	37
Abbildung 7 Serumkonzentrationen von Cathelicidin in ng/ml an Tag 43 der Therapie aufgeteilt in Therapietypen	39
Abbildung 8 Graphische Darstellung der Cathelicidinkonzentrationen in ng/ml im zeitlichen Therapieverlauf der Patienten mit Behandlung nach dem Dense-R-CHOP (1,4,8,15,22,29,43) Schema	41
Abbildung 9 Graphische Darstellung der Cathelicidinkonzentrationen in ng/ml im zeitlichen Therapieverlauf der Patienten mit Behandlung nach dem regulären R-CHOP (1,15,29,43) Schema	42
Abbildung 10 Graphische Darstellung der Vitamin-D-Konzentration in ng/ml an Tag 1 der Therapie beider Patientengruppen (R-CHOP und Dense-R-CHOP). *gemessene Vitamin- D-Konzentration $\leq 4\text{ng/ml}$	44
Abbildung 11 Korrelation der durchschnittlichen Cathelicidinkonzentrationen im Therapieverlauf und der patientenzugehörigen Vitamin-D-Konzentration in ng/ml an Tag 1 der Therapie	45

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Ann-Arbor Klassifikation ³⁴	10
Tabelle 2 Studien zum Therapievergleich von R-CHOP vs. CHOP bei bisher unbehandelten Patienten mit DLBCL zeigen verbesserte Therapieergebnisse nach einer Kombinationstherapie mit Rituximab	13
Tabelle 3 Studiendaten der untersuchten Serumproben	33
Tabelle 4 Statistische Auswertung zu Cathelicidinmessungen der Serumproben an Tag 1	35
Tabelle 5 Statistische Auswertung zu Cathelicidinmessungen der Serumproben an Tag 15	36
Tabelle 6 Statistische Auswertung zu Cathelicidinmessungen der Serumproben an Tag 29	37
Tabelle 7 Statistische Auswertung zu Cathelicidin-Messungen der Serumproben an Tag 43	39
Tabelle 8 Werte der Cathelicidinkonzentrationen in ng/ml während der Therapie, Entwicklung der Cathelicidinkonzentrationen in % im Therapieverlauf	43
Tabelle 9 Korrelation zwischen Cathelicidinkonzentrationen, Verlauf der Cathelicidinkonzentrationen sowie gemessener Vitamin-D-Konzentration	45

Danksagung

Dank gebührt Herrn Professor Pfreundschuh, Direktor der Klinik für Onkologie, Hämatologie, Klinische Immunologie und Rheumatologie des Universitätsklinikums des Saarlandes, Homburg/Saar, für die Möglichkeit, meine Dissertation in seinem Haus durchführen zu dürfen. Nach dem plötzlichen Tod von Herrn Prof. Dr. Pfreundschuh möchte ich mich ebenfalls bei Ihnen, Herr Prof. Dr. Aßmann, für die abschließende Korrektur dieser Arbeit als Doktorvater bedanken.

Ganz besonders danken möchte ich Herrn Dr. Bittenbring für das „offene Ohr“, die aufmunternden Worte und natürlich die zuverlässige und professionelle Betreuung. Sie war maßgeblich für diese Dissertation.

Ein weiterer Dank gilt Frau Natalie Fadle für die Betreuung im José-Carreras-Zentrum der Universitätsklinik des Saarlandes und an Frau Dipl.-Stat. Gudrun Wagenpfeil aus dem Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik der Universität des Saarlandes für die schnelle Lösungshilfe bei SPSS-Bedienungsproblemen.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern nicht nur für das mehrmalige Lesen dieser Arbeit und die bedingungslose Unterstützung, sondern auch für die Ermöglichung meines Medizinstudiums und die vielen ermutigenden Worte.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen:

- Gudrun Wagenpfeil; Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik; Überprüfung der von mir erstellten Berechnungen, Tabellen und Graphiken sowie Verbesserungsvorschläge bei der Anwendung des spss-Programms.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater/innen oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Außer den Angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe. Vor Aufnahme der vorstehenden Versicherung an Eides Statt wurde ich über die Bedeutung einer eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung belehrt.

München den,

Viviane Vosgerau

Unterschrift der die Versicherung an Eides statt
aufnehmende Beamtin bzw. des aufnehmenden
Beamten

